

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**Genotipificación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidas en una región de alta incidencia mediante la técnica molecular 24 MIRU-VNTR**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista  
Biotecnólogo

**AUTOR**

Luis José Jaramillo Valverde

**ASESORES**

Marco Antonio Galarza Pérez

Ruth García de la Guarda

Lima - Perú

2015

## DEDICATORIA

A mis padres, Hilda y José Luis,  
que me dieron la vida y han estado  
conmigo en todo momento, por su  
amor, comprensión y entrega.

A mis queridas hermanas,  
Betty e Hilda, por su amistad,  
apoyo, compañía y amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mis padres, por educarme, enseñarme, amarme y por el apoyo en el desarrollo de esta tesis. A mis hermanas, por confiar en mí, por su cariño y amistad. A mi abuelita Mila que desde el cielo, sé que intercede por mí antes Dios. A mis tíos y primos que siempre estuvieron conmigo demostrándome su cariño y apoyo.

Al PhD Heinner Guio Chunga, jefe del Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular (LBBM) del Instituto Nacional de Salud (INS), por su generosidad al brindarme la oportunidad de desarrollar la presente tesis en el laboratorio, por el asesoramiento temático en el campo de la tuberculosis y su experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la realización de este trabajo.

Un agradecimiento muy especial a mi asesor externo, Blgo. Marco Galarza Pérez, por confiar plenamente en mí brindándome todo su apoyo desde el inicio de mi estancia en el laboratorio, por su amistad, dedicación incondicional, por su sincero y desinteresado apoyo en la elaboración de esta tesis y por sus conocimientos en busca del mejoramiento y desarrollo de la misma. Muchas gracias amigo Marco.

A mi asesora interna, Mag. Ruth García de la Guarda, por sus valiosas sugerencias, críticas y acertados aportes durante la revisión del proyecto e informe final de tesis además de los consejos que me brindó en el desarrollo de mi perfil profesional.

A mis amigos y compañeros del LBBM: Omar C., Harrison M., Henri B., David G., Víctor B. a quienes tuve la suerte de conocer y que me apoyaron poniendo su valioso grano de arena durante la realización de mi tesis. También, a aquella persona especial por muchos momentos de tranquilidad y apoyo para seguir adelante.

A mi querida Escuela de Genética y Biotecnología que me enseñó más que nociones teóricas y prácticas, y a su Director, el Mg. Fernando Retuerto Prieto. A todos aquellos profesores y amigos que de una u otra manera me dieron consejos y ánimos para seguir adelante. Muchas gracias a ellos también.

## ABREVIATURAS

AFLP	Amplified fragment length polymorphism (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados)
APP	Agar Plate Proportions (Proporciones en Agar en Placa)
BAAR	Bacilo Ácido-Alcohol Resistente
Circulación fija	Cepas circulantes en un determinado lugar cerrado
Circulación continua	Cepas circulantes en lugar abierto con alto flujo génico
DIRESA	Dirección Regional de Salud
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxrrribonucleótido
DR	Direct Repeat (Repetición Directa)
Hbtes	Habitantes
IS	Insertion Sequence (Secuencia de inserción)
LJ	Löwenstein-Jensen
MDR	Multi-drug-resistant (Multidrogo resistente)
MINSA	Ministerio de Salud
MIRU	Mycobacterial Interspered Repetitive Unit (Unidades repetitivas interespaciadas de micobacterias)
MODS	Microscopic Observation Drug Susceptibility (Susceptibilidad a drogas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mediante observación microscópica)
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramo



OK	Ogawa-Kudoh
OMS	Organización Mundial de la Salud
Orphans	Cepa con un genotipo único que no tiene ningún homólogo en la base de datos mundial <i>SpoIDB4</i>
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
pb	Pares de bases
pg	Picogramos
RFLP	Restriction Fragment Length Polimorphism (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)
RAPD	Ramdon Amplified Polymorphic DNA (DNA Polimórfico Amplificado al Azar)
SNP	Single Nucleotide Polimorphism (Polimorfismo de nucleótido simple)
Spoligotyping	Spacer oligonucleotide typing (Tipificación de oligonucleótido espaciador)
TAE	Tris, Acetato y EDTA
TB	Tuberculosis
µg	Microgramo
µL	Microlitro
VIH	Human Immunodeficiency Virus (Virus de la Inmunodeficiencia Humana)
VNTR	<i>Variable number tandem repeat</i> (Número variable de repeticiones en tándem)
XDR	Extensively <i>drug-resistant</i> (Extremadamente resistente)
°C	Grados Celsius
T°	Temperatura

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS .....	I
ÍNDICE DE TABLAS .....	III
RESUMEN .....	IV
ABSTRACT .....	V
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
II.1. Definición de tuberculosis.....	5
II.2. Clasificación taxonómica de MTB.....	5
II.3. Características de las micobacterias .....	6
II.4. Diagnóstico de la infección tuberculosa.....	8
II.5. Epidemiología molecular de MTB.....	11
II.6. Ventajas en los métodos de genotipificación .....	18
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
III.1 Hipótesis .....	20
III.2 Objetivos .....	20
III.2.1 General.....	20
III.2.2 Específicos .....	20
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
IV.1. Material Biológico (Población y muestra) .....	21
IV.2. Criterios de selección.....	22
IV.3. Reactivos .....	22
IV.4. Software.....	23
IV.5. Métodos .....	23
IV.5.1. Muestra.....	23
IV.5.2. Genotipificación .....	24
IV.5.3. Análisis e interpretación de resultados.....	25

<b>V. RESULTADOS</b>	28
V.1. Estudio epidemiológico de la tuberculosis.....	28
V.2. Estudio molecular de transmisión de tuberculosis.....	31
V.3. Estudio comparativo de cepas de circulación fija con cepas de circulación continua.....	46
V.4. Poder discriminatorio de la metodología 24 MIRU-VNTR.....	47
V.5. Análisis estadístico de los aislamientos agrupados.....	48
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	49
VI.1. Epidemiología de la tuberculosis en la Región Callao.....	49
VI.2. Estudio genotípico molecular.....	52
VI.3. Genotipificación piloto en el Penal Sarita Colonia.....	58
VI.4. Sobre la metodología 24 MIRU-VNTR.....	59
VI.5. Importancia del Estudio.....	59
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	60
<b>VIII. RECOMENDACIONES</b>	61
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	63
<b>X. ANEXOS</b>	82
ANEXO I: Secuencias de iniciadores (primers) de cada uno de los locus MIRUs.....	83
ANEXO II: Estandarización de componentes de PCR (µL) para cada MIRU.....	84
ANEXO III: Marcador de peso molecular de 100 pares de bases.....	85
ANEXO IV: Tabla 9: Número de repeticiones alélicas usando 24 estándares MIRU-VNTR.....	86
ANEXO V: Cuantificación de DNA de las 133 cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> estudiadas.....	87
ANEXO VI: Distribución de perfiles genéticos.....	88
ANEXO VII: Árbol filogenético NJ de 133 cepas de <i>M. tuberculosis</i> de la Región Callao + 186 cepas de <i>M. tuberculosis</i> de la base de datos <i>SpolDB 4.0</i> .....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Esquema de la pared celular de las micobacterias .....	7
Figura 2: Flujograma de pruebas diagnósticas en sospecha de TB MDR en Lima y Callao 2012.....	12
Figura 3: Ubicación de marcadores moleculares en el cromosoma de <i>M. tuberculosis</i> para genotipificación: RFLP-IS6110, <i>Spoligotyping</i> y MIRU- VNTR. ....	14
Figura 4: Número de locus MIRUs identificados en el cromosoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con su nomenclatura.....	15
Figura 5: Mapa de la Región Callao. ....	21
Figura 6: MIRU - VNTRplus Home - Page, herramienta útil para determinar los linajes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	25
Figura 7: Diagrama metodológico para la genotipificación de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> utilizando 24 MIRU-VNTR.....	27
Figura 8: Distribución de pacientes según la Red de Salud donde se atendieron. ....	29
Figura 9: Electroforesis de MIRU-VNTR de 24 loci de la cepa H37Rv .....	31
Figura 10: Electroforesis de MIRU-VNTR de 24 loci de la cepa 6358/13.....	32
Figura 11: Electroforesis de MIRU-VNTR de 24 loci de la cepa 2212/13.....	32
Figura 12: Distribución geográfica de Centros de Salud y de pacientes MDR .....	33
Figura 13: Linajes prevalentes en 133 cepas de <i>M. tuberculosis</i> de la Región Callao .....	35
Figura 14: Dendrograma basado en distancias obtenidas a partir del análisis de 24 MIRU-VNTR de 133 cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de la Región Callao. ....	35
Figura 15: Linajes prevalentes de 133 cepas de <i>M. tuberculosis</i> según género de la Región Callao. ....	38

Figura 16: Árbol filogenético Neighbor Joining de 133 cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Determinación de patrones únicos y agrupados. ....	39
Figura 17: Comparación por agrupamiento en un árbol filogenético de 66 cepas MDR y 67 sensibles de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	42
Figura 18: Mapa de la Región Callao mostrando los linajes prevalentes de 133 cepas de <i>M. tuberculosis</i> por Red de Salud .....	43
Figura 19: Linajes prevalentes de 133 cepas de <i>M. tuberculosis</i> por Red de Salud de la Región Callao. ....	44
Figura 20: Linajes prevalentes de 66 cepas MDR de <i>M. tuberculosis</i> por Red de Salud de la Región Callao. ....	45
Figura 21: Comparación por agrupamiento en un árbol filogenético de 8 cepas MTB provenientes de Penal y 9 cepas MTB de Hospital HNDAC.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1: Ciclos de temperatura para amplificación .....	24
Tabla 2: Frecuencia del sexo y edad de la población .....	28
Tabla 3: Frecuencias de los tipos de resistencia a drogas de las cepas.....	29
Tabla 4: Frecuencia de resistencia a drogas antituberculosas en la población de estudio de la Región Callao.....	30
Tabla 5: Frecuencias y porcentajes de los casos MDR. ....	30
Tabla 6: Diversidad alélica MIRU-VNTR en 133 cepas de <i>M. tuberculosis</i> de la Región Callao.....	36
Tabla 7: Poder discriminatorio de 24 MIRU-VNTR en 133 cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de la Región Callao. ....	48
Tabla 8: Relación entre agrupamiento con variables clínicas y demográficas. ....	48
Tabla 9: Número de repeticiones alélicas usando 24 estándares MIRU-VNTR. ....	86

## RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica infecciosa causada por los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. En el Perú la incidencia de TB en el año 2013 fue de 32 000 casos por 100 000 habitantes, por lo que se considera un problema de salud pública. El desarrollo de métodos moleculares para la caracterización genotípica como son las unidades repetitivas interespaciadas de micobacterias (MIRU-VNTR), proporcionan información útil para el control epidemiológico y prevención de casos. Sin embargo, estudios de epidemiología molecular de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) en una región con alta incidencia de TB, como es el caso de la Región Callao, aún no se han realizado. El objetivo de este estudio fue identificar los linajes de MTB en la Región Callao utilizando la metodología MIRU-VNTR.

El estudio comprendió 133 muestras de DNA obtenidas a partir de aislamientos de MTB en medio sólido Löwenstein - Jensen (LJ). La genotipificación de MTB se realizó utilizando 24 MIRU-VNTR. Los resultados reportaron un alto poder discriminatorio de este método con un HGDI de 0.995, y el linaje LAM fue el más prevalente (51.1 %), seguido por Haarlem (18.8 %), el linaje asiático Beijing (8.3 %), el linaje Uganda se identificó en el 6% y los linajes T y S se observaron con un 2.3 % y 0.8 %, respectivamente. Se identificaron como *Orphans* (huérfanos) un 8.3 % de las cepas analizadas.

La Región Callao muestra una gran diversidad de linajes; así como, la presencia de patrones huérfanos endémicos. Esta información permite reconocer los linajes que se encuentran circulando en toda la región, así mismo su posible relación con multidrogorresistencia, lo cual será de gran utilidad al sector salud, para establecer programas de control y prevención oportuna de casos de tuberculosis.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, MDR, MIRU-VNTR, HGDI, linaje.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex species. In Perú, the incidence of TB in 2013 was 32 000 cases per 100 000 population, which is considered a public health problem. The development of molecular methods for genotypic characterization as mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU-VNTR) provide useful information to epidemiological control and prevention of cases. However, molecular epidemiology studies of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in a region with high incidence of TB, such as the Callao Region, still have not been performed. The aim of this study was to identify the lineages of MTB in Callao Region using MIRU-VNTR methodology.

The study included 133 DNA samples obtained from isolates of MTB in solid Löwenstein - Jensen medium (LJ). MTB genotyping was performed using 24 MIRU-VNTR. The results indicated a high discriminatory power of this method with a HGDI of 0.995, and the LAM lineage was the most prevalent (51.1 %), followed by Haarlem (18.8 %), the Asian lineage Beijing (8.3 %), Uganda lineage was identified in 6 % , T and S were observed 2.3 % and 0.8 % respectively. There were identified as orphans 8.3 % of the strains tested.

The Callao Region shows great diversity of lineages, as well as the presence of endemic orphans patterns. This information allows us to recognize the lineages that are circulating throughout the region, also its possible relationship with multidrug resistance, which will be useful to the health sector to establish control programs and timely prevention of tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, MDR, MIRU-VNTR, HGDI, lineage.



## I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), es un problema de salud global en la actualidad, y sigue siendo la principal causa de muerte por enfermedad infecciosa curable en el mundo a pesar de la amplia disponibilidad de intervenciones efectivas para su control (Dye, 2006). Actualmente, la TB ocupa el séptimo lugar de causas de muerte en el ranking mundial (Mathers *et al.*, 2005). En el 2013, se reportaron 9 millones de casos nuevos de TB equivalente a 126 casos por 100 000 personas; así como, 1.5 millones de muertes a causa de esta enfermedad (WHO, 2014). La aparición de cepas multidrogorresistentes (MDR) y extremadamente resistentes a drogas (XDR), además del aumento de la incidencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) han contribuido a la difusión y a la reactivación de la enfermedad. Esto indudablemente se contrapone a los lineamientos de la Organización Mundial de Salud (OMS), que busca reducir la tasa de prevalencia y mortalidad causada por TB hasta un 50% en el 2015 y su total eliminación como un problema de salud pública para el 2050 (WHO, 2010).

Aunque el número de casos nuevos de TB en el Perú ha disminuido entre 1990 (183.3 casos por 100 000 personas) y el 2010 (96.1 casos por 100 000 personas), la tasa de incidencia es aún alta (MINSA, 2011). De acuerdo con el Programa Nacional de Tuberculosis, 17 264 casos nuevos de TB pulmonar fueron notificados en el Perú en el 2010 (MINSA, 2011), la mayoría (58%) casos fueron notificados en Lima y Callao. Perú representa sólo el 3% de la población de las Américas; sin embargo, el 12% de pacientes con TB y el 32% de pacientes MDR de la región reside en el país (WHO, 2012). Durante el año 2013, se registraron 31 mil casos de TB sensible, 1260 casos de TB-MDR y 66 casos de TB-XDR en el Perú (DIRESA CALLAO, 2013). Existen muchas evidencias acerca de la variación en la capacidad de MTB para

difundirse entre cepas; así como, que las cepas presentan diferentes geografías y hospederos específicos (Filliol *et al.*, 2006; Gagneux *et al.*, 2006).

Lima y Callao presentan el 54 % de los casos de TB, 82 % de casos MDR y 89 % de casos XDR en la actualidad (MINSA, 2013). La Región Callao es uno de los lugares con alta carga de TB, en el 2013 su tasa de morbilidad fue de 133 casos por 100 000 habitantes y su tasa de incidencia fue de 110 casos por 100 000 habitantes, además de diagnosticarse 296 casos nuevos de TB-MDR (DIRESA CALLAO, 2013). La Región Callao está compuesta por 3 redes de salud: Red Bonilla (Callao, La Punta), Red BEPECA (Bellavista, La Perla, Carmen de la Legua) y Red Ventanilla (Ventanilla). Por otro lado, si se observan las tasas a nivel de las Redes de Salud de la Región Callao, se encuentra que estos indicadores no son iguales en las tres Redes, y que cada una de ellas merece un análisis particular en relación a sus problemas propios. La Red Bonilla presenta una alta tasa de mortalidad ( $159.24 \times 100\,000$  Hbtes), la cual es elevada en relación a las otras dos redes y que nos habla de una mayor probabilidad de contagiarse debido al hacinamiento que hay en muchos hogares pertenecientes a la Red y los factores asociados que un considerable grupo de pacientes conllevan como son las comorbilidades y otros aspectos sociales: alcoholismo, drogadicción, personas privadas de su libertad, personas con antecedentes penales, entre otras (DIRESA CALLAO, 2013).

Existe una alta diversidad genética de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a nivel mundial que causan la enfermedad, se han descrito como prevalentes en el mundo los linajes: Haarlem (H), Latino América-Mediterráneo (LAM), T, Este de África-India (EAI), Central-Asia (CAS), X y Beijing. Cada nombre está atribuido al lugar de procedencia donde se identificó inicialmente. A pesar de esto, no se conocen los linajes circulantes de MTB que afectan a la población del Callao, ni la prevalencia de infección por cepas resistentes.

Los estudios moleculares de MTB permiten la investigación de la epidemiología de TB, revelando perspectivas sobre la diferencias en el éxito de transmisión de las cepas; mientras que la observación y el análisis de la epidemiología puede comprobar hipótesis acerca de la biología de la cepa (Demay *et al.*, 2012). Los métodos epidemiológicos moleculares podrían ayudar a comprender mejor la dinámica de la población con TB de la Región Callao. En general, no hay datos disponibles sobre la epidemiología molecular actual de las cepas circulantes de MTB en el Perú. La información de la diversidad de MTB colectada en bases de datos mundiales proporciona una plataforma sólida para la investigación en filogenia y virulencia (Streicher *et al.*, 2007). Existen 2 bases de datos para poder identificar linajes de MTB: La base de datos *SpolDB 4.0* que comprende sólo 96 cepas peruanas de las 39 609 cepas publicadas (Brudey *et al.*, 2006) y la base *Homepage MIRU-VNTRplus* (Allix-Béguec *et al.*, 2008). Estas metodologías contribuyen al diseño de medidas racionales para el control de TB.

Desde el descubrimiento de polimorfismos de DNA en MTB, la genotipificación molecular de las cepas tiene un valor incalculable para el estudio de la epidemiología de la tuberculosis (Murray *et al.*, 2002). Los estudios epidemiológicos de TB en todo el mundo (Candia *et al.* 2007, Sharma *et al.* 2008, Valcheva *et al.* 2008), se han basado en el supuesto de que los pacientes con cepas genotípicamente agrupadas están epidemiológicamente vinculadas y representan transmisiones recientes. En contraste, los pacientes infectados con diferentes tipos de cepas no se consideran indicativos de transmisión reciente. Por lo tanto, el uso de marcadores genéticos polimórficos estables permitiría distinguir cepas no relacionadas; así como, identificar aislados de las mismas cepas. Además, estos métodos de caracterización empleados deben ser reproducibles, discriminatorios y fáciles de realizar. Se han propuesto varias técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para genotipificar cepas de MTB. El Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) – IS6110 es la

técnica de referencia y la más utilizada en todo el mundo (van Embden *et al.*, 1993) debido a su alta capacidad de discriminación (Kremer *et al.*, 1999). El *Spoligotyping* es otro método basado en la amplificación de la región de agrupación DR (repetición directa variable) (Cronin *et al.*, 2002). Un enfoque más reciente es el análisis de múltiples *loci* que contienen un número variable de repeticiones en tándem (VNTR) de unidades repetitivas intercaladas de micobacterias (MIRUS), la cual se basa en el polimorfismo de 24 MIRU-VNTR *loci* y permite un análisis fácil de los datos que se pueden comparar con la base de dato mundial *SpolDB 4.0* (van Embden *et al.*, 1993; Kremer *et al.*, 1999; Kanduma *et al.*, 2003). Recientemente, dos estudios han revelado que el uso de SNPs (polimorfismos de nucleótido simple) son marcadores filogenéticos altamente valorables (Filliol *et al.*, 2006; Gutacker *et al.*, 2006). Por lo tanto, los SNPs pueden ser marcadores útiles tanto para la identificación de especies del complejo MTB y la determinación de genotipos de aislados de *M. tuberculosis*.

La metodología MIRU-VNTR ha proporcionado una resolución comparable a IS6110-RFLP, lo que sugiere que este método puede ser utilizado en los estudios epidemiológicos de la TB para detectar eventos clave como transmisiones y reemergencias (Mazars *et al.*, 2001; Supply *et al.*, 2001).

Los estudios de genotipificación en MTB han permitido determinar su estructura poblacional y evolución mediante la cuantificación de las asociaciones entre el genotipo de la cepa con fenotipos de resistencia a fármacos, además de determinar el linaje prevalente y otros factores epidemiológicos incluyendo el origen geográfico. Esto contribuye a mejorar el desarrollo de estrategias para el control de la enfermedad.

El objetivo de este estudio será identificar la diversidad de linajes de MTB que circulan en la Región Callao - Perú y determinar su asociación a la resistencia a drogas antituberculosas de primera línea, transmisión y clonalidad.

## II. MARCO TEÓRICO

### II.1. Definición de tuberculosis

La TB es una enfermedad sistémica, infecciosa y crónica que afecta mayormente al sistema respiratorio. Producida principalmente por especies del complejo MTB: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microtti*, que pueden afectar a humanos (Brosch *et al.*, 2002). La infección se adquiere habitualmente en etapas tempranas de la vida, condicionando a una infección aguda frecuentemente asintomática con desarrollo de inmunidad, formación de granuloma y calcificación, denominándose a esto tuberculosis latente (TBL) (Daniel *et al.*, 1994). La TB afecta principalmente los sistemas respiratorio, digestivo, linfático y renal, atacando al estado general, de manera que si no es tratada oportuna y eficientemente puede llevar a la muerte a quien la padece. La TB pulmonar es la forma más frecuente e infectante; así como, de mayor importancia epidemiológica, por lo que es considerada como un problema de salud pública en nuestro país (Van Soolingen, 2001).

### II.2. Clasificación taxonómica de MTB

Dominio: Bacteria

Phylum: Actinobacteria

Clase: Actinobacteria

Subclase: Actinobacteridae

Orden: Actinomycetales

Suborden: Corynebacterineae

Familia: Mycobacteriaceae

Género: *Mycobacterium*

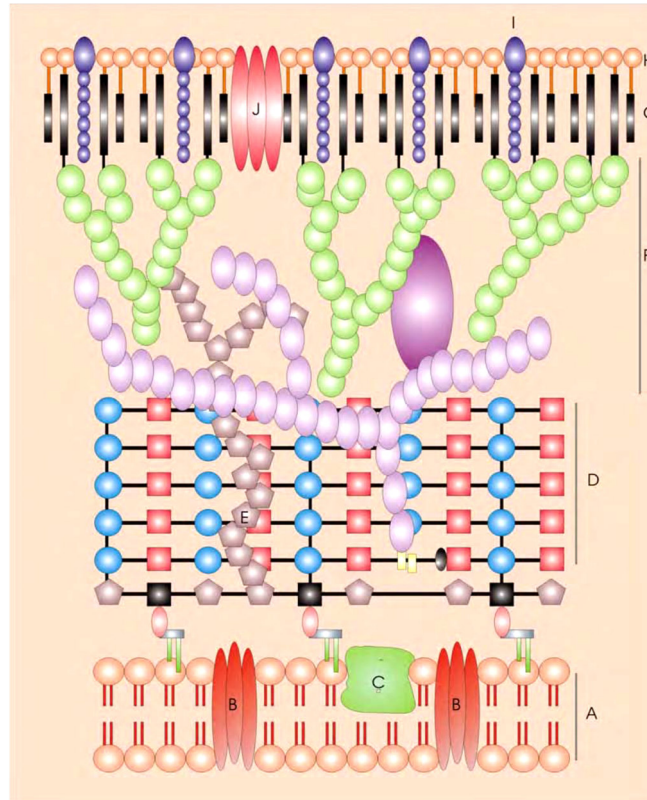
Especie: *Mycobacterium tuberculosis*

«*Mycobacterium tuberculosis*». **Sanger Institute** (2007)

### II.3. Características de las micobacterias

Las micobacterias son bacilos largos de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud o curvos en forma de maza, inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos citoplasmáticos, resistentes a la tinción con colorantes comunes, resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol-ácido, algunos son aerobios, con crecimiento rápido y lento. Su estructura es rica en lípidos (20-60 %), oportunistas y saprofitas.

MTB y otras micobacterias son biológicamente similares a las bacterias Gram+, aunque frente a la tinción de Gram las micobacterias son débilmente Gram+ o no se tiñen. Su membrana consiste en dos partes principales: la membrana plasmática y, alrededor de ella, la pared celular. La primera le otorga a la célula protección osmótica, además de transporte de iones y moléculas; en tanto que la segunda le brinda soporte mecánico y protección. La pared celular está constituida por tres capas: la capa interna, compuesta por peptidoglicano como en otras bacterias; la capa media, compuesta por el polisacárido arabinogalactano, cuyos extremos están esterificados con ácidos grasos de alto peso molecular, los ácidos micólicos, únicos para las micobacterias; y la capa exterior compuesta por una estructura glucolípida. La membrana plasmática tiene como característica la presencia de moléculas lipopolisacáridos, lipoarabinomananos, lipomananos y fosfatidil-inositol-manósidos (**Figura 1**). Son bacilos ácido-alcohol resistentes por lo cual se tiñen mediante la coloración Ziehl-Neelsen, método basado en la coloración con fucsina y decoloración con HCl (Kasper *et al.*, 2005).



**Figura 1:** Esquema de la pared celular de las micobacterias (Hong y Hopfinger, 2004). A: Membrana plasmática, B: Proteína transversal, C: Proteína no transversal, D: Peptidoglucano, E: Lipoarabinomano, F: Arabinogalactano, G: Ácidos micólicos, H: Glicolípidos, I: Lípidos libres, J: Porina.

La mayoría de las micobacterias patógenas tienen un crecimiento lento, después de 3 a 4 semanas se pueden observar las colonias (Van Embden *et al.*, 1993). Las micobacterias son capaces de sobrevivir por largos periodos, siempre y cuando se encuentren aisladas de la luz solar ya que la luz ultravioleta y una temperatura mayor a 65 °C las inactiva, de igual manera poseen una mayor resistencia a los ácidos, álcalis y desinfectantes que el resto de las bacterias, además son resistentes a la deshidratación y la congelación (Dorronsoro *et al.*, 2007).

El genoma completo de MTB fue descrito por el Instituto Sanger en el año 1998. Comprende alrededor de 4 411 532 pb, que conforman aproximadamente 4 000 genes distribuidos equitativamente en el DNA; se conocen las funciones precisas o por lo

menos supuestas en el 52 % de estos genes, para el 48 % restante se desconocen sus funciones. Entre el 3 y 4 % del genoma de la bacteria está conformado por secuencias de inserción (IS), siendo IS6110 la más empleada por su capacidad polimórfica para la clasificación de MTB (Cole, 2002).

#### **II.4. Diagnóstico de la infección tuberculosa**

El diagnóstico de TB se lleva a cabo a partir de la identificación de la bacteria en muestras provenientes del tracto respiratorio en caso de TB pulmonar, o de secreciones, líquidos o biopsias de otras partes del cuerpo (TB extrapulmonar) (Jacobs, 1994). Para la identificación de especies del complejo MTB se debe tener en cuenta: velocidad de crecimiento, características morfológicas de las colonias, y resultados de las pruebas bioquímicas como catalasa a T° ambiente, prueba de nitratos, prueba de niacina cuyos resultados en bacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* son reacciones positivas (León et al., 2002).

Uno de los métodos con más de 100 años para el diagnóstico inicial de TB es la baciloscopía, la cual busca la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), también se utiliza el cultivo de los especímenes clínicos en medio de Ogawa-Kudoh (OK) o Löwenstein-Jensen (LJ). La baciloscopía se basa en la capacidad de las micobacterias para formar complejos estables con ciertos colorantes de arylmetano como la fucsina, la cual penetra en la pared celular uniéndose a los complejos micolil arabinogalactano. Este complejo retiene el colorante aún después de su exposición al ácido alcohol o ácidos minerales. Esta condición es requerida para que un microorganismo sea denominado ácido-alcohol resistente.

Las coloraciones que demuestran la condición de ácido-alcohol resistencia de las micobacterias son el Ziehl-Neelsen y el Kinyoun (Fleischmann *et al.*, 2002). Es un método ventajoso para el diagnóstico de TB ya que es una técnica relativamente



sencilla, de muy bajo costo, pero presenta problemas a nivel de sensibilidad, ya que en pacientes que no expulsan gran cantidad de bacilos no es posible detectarlos, en estos casos se realiza el cultivo, el cual sirve para diagnosticar los pacientes con baja carga bacilar, pero presenta el inconveniente que demora mucho el crecimiento y por lo tanto el diagnóstico, pero es muy útil para los pacientes que presentan resistencia a medicamentos, para la posterior realización de pruebas de sensibilidad a medicamentos antituberculosos (Warren *et al.*, 2004; Fujiki A., 2009). El mayor inconveniente de la baciloscopía es su baja sensibilidad, 40 – 60 % como se indica en una revisión (Lima *et al.*, 2008). Sin embargo ha surgido el método de baciloscopía concentrada con hipoclorito de sodio que aumenta la sensibilidad a 70 % aproximadamente, este método es de alta validez, casi semejante al cultivo, para el diagnóstico de tuberculosis en estos grupos de pacientes con radiografía anormal y BK negativo; siendo el costo y tiempo mínimo; así como, accesible a cualquier nivel básico de laboratorio (Barón *et al.*, 2012).

Otras metodologías que apoyan el diagnóstico de la TB son los rayos X, métodos inmunológicos tales como el Elisa, la realización de la prueba de la tuberculina (León *et al.*, 2002; Huebner *et al.*, 1993) que actualmente ha caído en desuso; métodos automatizados para la detección rápida de crecimiento bacteriano como BACTEC MGIT (CDC, 2006) que permite obtener resultados de pruebas de susceptibilidad a drogas anti-TB en un menor tiempo que el método de proporciones, donde BACTEC MGIT 960 presenta la ventaja considerable de ser un método no radioactivo (Tortoli *et al.*, 2002); y pruebas de biología molecular como PCR que amplifica la secuencia de inserción IS6110, característica del complejo MTB (Van Embden *et al.*, 1993). También el método PARA (PCR Restriction Analysis), en el cual se realiza una amplificación del gen *hsp 65* y el producto de PCR se corta con enzimas de restricción (Telenti *et al.*, 1993); la cuantificación de interferón gamma (Quantiferon) (Middlebrook *et al.*, 1977), ésta técnica se basa en la detección del IFN-gamma liberado como respuesta a la

estimulación *in vitro* de las células T sensibilizadas, presentes en sangre periférica, con antígenos específicos de MTB (Lalvani *et al*, 2001).

En el Perú la aplicación de los sistemas de tratamiento moderno se iniciaron en la red de Seguridad Social en 1978, y en el Ministerio de Salud como proyecto piloto en 1983 (Plan Regional de Tuberculosis, 2006 - 2015). Así durante 1980 se seguía aplicando el esquema UNO (tratamiento basado en la administración de rifampicina, isoniacida, pirazinamida y ethambutol con seis meses de duración) a pacientes con antecedentes de tratamiento, de los cuales actualmente se sabe que eran resistentes a antibióticos. Por lo que de esta manera se dio comienzo a la endemia de TB-MDR en el Perú (MINSA, 2006). Recién en 1990 llega el Tratamiento Acortado Directamente Observado (DOTS) al Perú, en el cual la toma de antibióticos se realiza en forma simultánea, diaria y a la misma hora (WHO, 2008). Recién en el año 2005 se uniformizan los criterios y técnicas empleadas en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis MDR en el país, en el que se aconseja aplicar los retratamientos individualizados para estos casos.

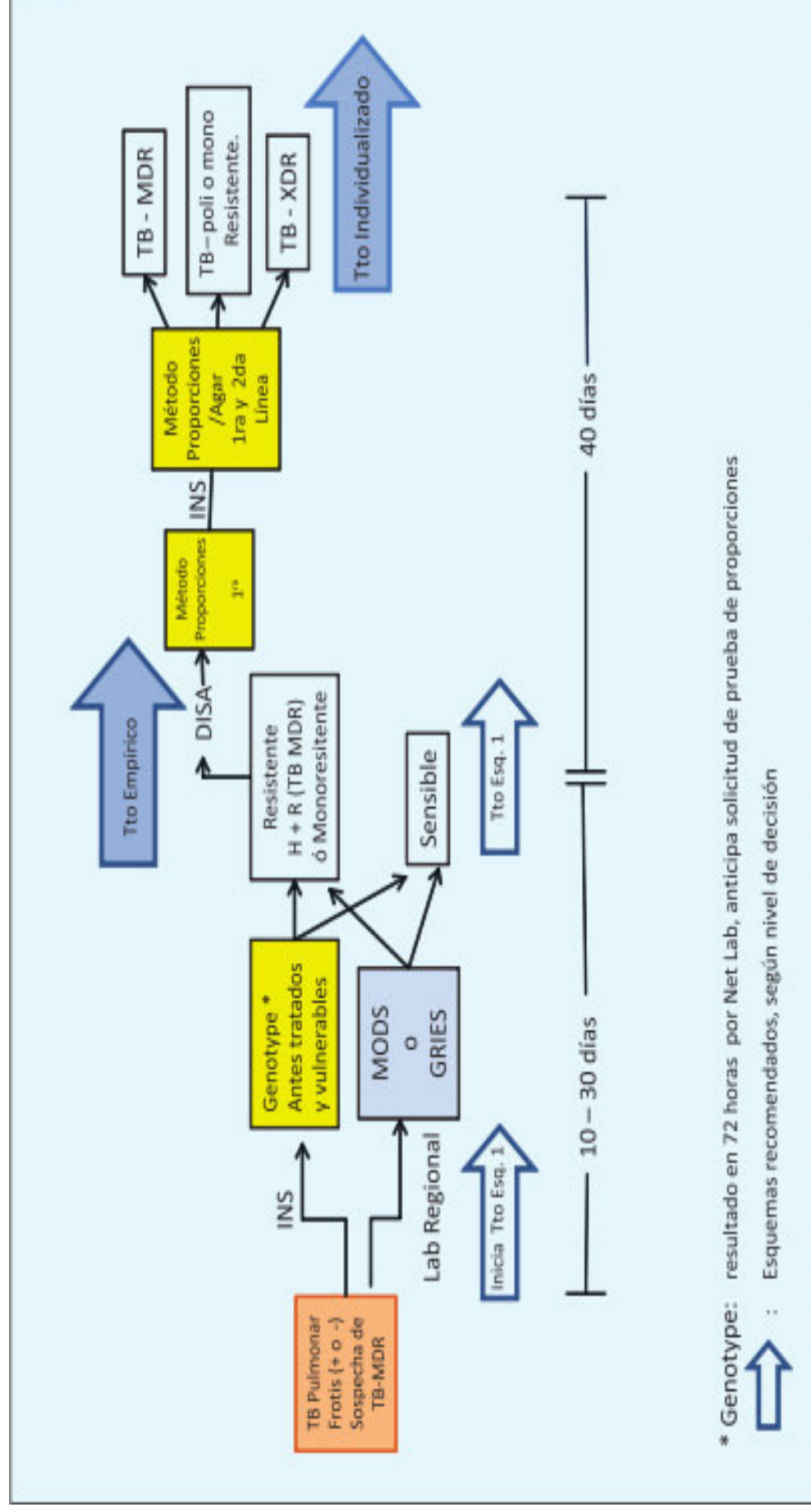
Actualmente en nuestro país se utilizan algunos métodos rápidos y moleculares para diagnóstico de TB-MDR (**Figura 2**), como por ejemplo, la prueba molecular Genotype®MTBDRplus (Asencios *et al.*, 2012) diseñada para la detección de resistencia a isoniacida y rifampicina en un máximo de 72h a partir de esputo o de cultivo, en comparación con los métodos microbiológicos que demandan mucho tiempo; así también, el método de APP que demora 30 días a partir del cultivo para la obtención del resultado, mientras los métodos de BACTEC-460 y MODS (Caviedes *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2006) demoran entre 8 a 15 días respectivamente, desde la obtención de la muestra hasta la emisión de los resultados. Se debe señalar que la prueba Genotype®MTBDRplus requiere que la muestra de esputo sea baciloscopia positiva para poder utilizarla (Hain Lifescience, 2010), constituyéndose en una

herramienta alternativa para la detección rápida de la resistencia de estas drogas antituberculosas.

## **II.5. Epidemiología molecular de MTB**

Actualmente la epidemiología molecular aplicada al estudio de enfermedades infecciosas, combina los métodos moleculares para la identificación de agentes patógenos con herramientas de la epidemiología convencional para el estudio de la distribución, comportamiento y factores de riesgo de una enfermedad (García, 2003). Los estudios de genética y epidemiología molecular describen que el genoma de MTB posee regiones bien conservadas de DNA específicas de género y regiones hipervariables específicas de especie (Sola *et al.*, 2001).

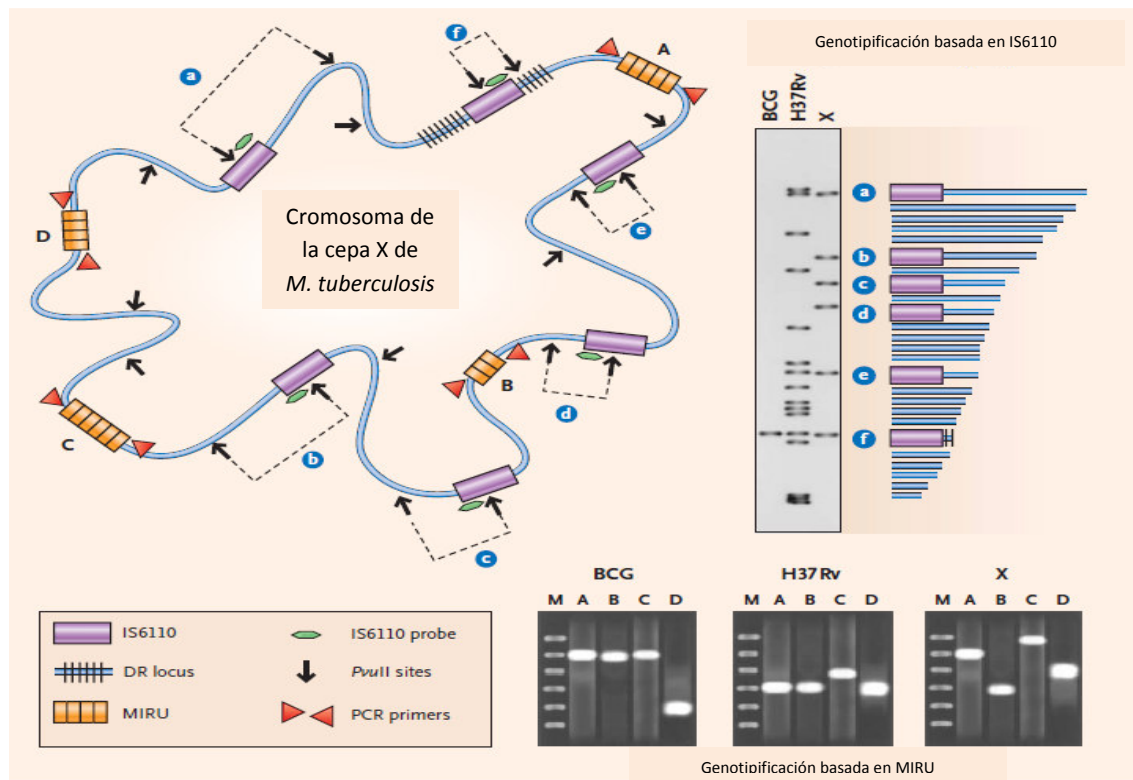
Los métodos moleculares utilizados para el estudio y caracterización de miembros del complejo MTB han brindado un gran avance en el conocimiento de la dinámica de transmisión de esta enfermedad, han permitido la revelación de las bases genéticas implicadas en el desarrollo de resistencia a medicamentos y caracterización de brotes epidémicos en poblaciones e identificación de linajes y familias del complejo (Van Embden *et al.*, 1993; Kamerbeek *et al.*, 1997; Supply *et al.*, 1997).



**Figura 2:** Flujoograma de pruebas diagnósticas en sospecha de TB MDR. Lima y Callao 2012 (Ticona, 2013).

La secuenciación total del genoma de MTB ha permitido identificar diversos marcadores genéticos utilizados para la caracterización y diferenciación de cepas que infectan personas en un período de tiempo determinado, los cuales facilitan la caracterización de las cepas sin tener que realizar la secuenciación completa de las bacterias, constituyendo un ahorro en costos y tiempo (**Figura 3**) (Kwara *et al.*, 2003; Hawkey *et al.*, 2003).

El desarrollo de metodologías de *fingerprinting* ha permitido realizar estudios de transmisión global de la enfermedad, que permiten una comparación de cepas circulantes en distintas poblaciones y de esta manera establecer si hay un flujo genético de una población a otra, caracterizar brotes, hacer distinción entre transmisiones recientes o antiguas, detectar si hay contaminación cruzada en el laboratorio, detección de reinfección o recaída en pacientes con episodios secundarios de TB, identificación de poblaciones con alto riesgo de transmisión para la posterior implementación de la estrategia de control adecuada para contrarrestar la transmisión (Van Soolingen, 2001; , Mostrom *et al.*, 2002; Peter *et al.*, 2003).

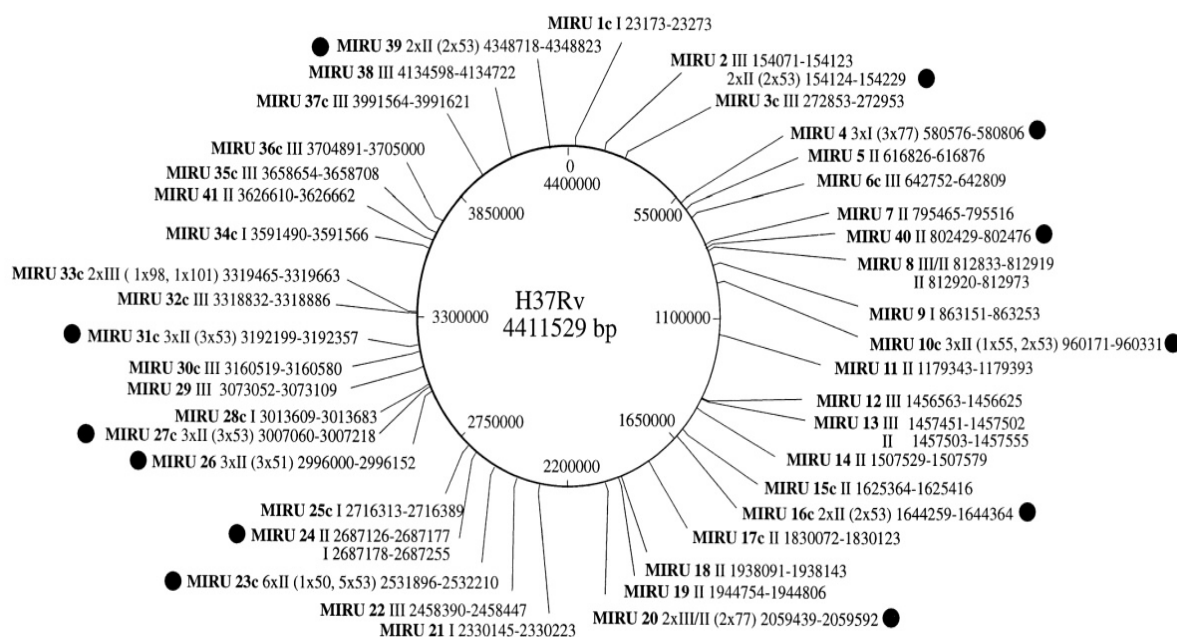


**Figura 3:** Ubicación de marcadores moleculares en el cromosoma de *M. tuberculosis* para genotipificación: RFLP-IS6110, *Spoligotyping* y MIRU-VNTR (Barnes et al., 2003).

Entre las técnicas más empleadas para el estudio genotípico de la TB, sobresalen la cuantificación de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción en la secuencia de inserción IS6110 (IS6110-RFLP), el *Spoligotyping* y el Número de Repeticiones Variables en Tándem de las Unidades Repetitivas Interespaciadoras en Micobacterias (MIRU-VNTR). En la actualidad la utilización en conjunto de las técnicas *Spoligotyping* y MIRU-VNTR han demostrado tener un alto índice de discriminación para diferenciar linajes; así como, un fácil manejo de datos, rapidez y bajos costos de reproductividad en laboratorios de diagnóstico (Nicol et al., 2008).

La genotipificación de MTB utilizando MIRU-VNTR, fue estandarizada por Supply et al. (1997). Los MIRUs son marcadores parecidos a las repeticiones en tándem de número variable (VNTR), las cuales están presentes en cientos de copias en los genomas de eucariotas superiores, estos están presentes en las especies del complejo MTB y en *M. leprae* (Supply et al., 1997; Supply et al., 2000).

Estos marcadores son denominados como microsatélites ya que su tamaño oscila entre los 40 y 100 pb, se presentan 41 unidades (**Figura 4**) de estos MIRUs en el genoma de MTB en regiones intergénicas. Inicialmente se describieron 12 *locus* altamente polimórficos, luego se describieron 15 *locus* más polimórficos, pero recientemente se ha descrito que 24 de estas unidades son altamente polimórficas y varían en el número de copias entre aislados de MTB no relacionados, confiriéndole un mayor poder discriminatorio a esta metodología y convirtiendo estas regiones en las estructuras más variables del genoma de MTB. Entre estos *loci* existen repeticiones en tándem similares a los microsatélites de humanos (Supply *et al.*, 1997-2000; Martin *et al.*, 2007; Sola *et al.*, 2003; Van Deutekom *et al.*, 2005).



**Figura 4:** Número de locus MIRUs identificados en el cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* con su nomenclatura (Supply *et al.*, 2006).

Los genes flanqueantes de estos *locus* MIRUs están implicados en actividades metabólicas y actividades regulatorias de las bacterias, incluyendo la biosíntesis o degradación de ácidos grasos, producción de energía y transducción de señales (Supply *et al.*, 2006; Frothingham *et al.*, 1998).

Los arreglos en los MIRUs son generados por la ocurrencia de eventos intra-alélicos sugiriendo la alta conservación de las secuencias repetidas en los MIRUs; es decir, que las variaciones en estas secuencias repetitivas son el resultado de una relajación en el control de recombinación entre secuencias parcialmente divergentes y la inhabilidad por parte de esta bacteria de corregir los errores producidos en la transcripción por la DNA polimerasa, lo cual hace que esta bacteria carezca de un sistema de reparación (Frothingham *et al.*, 1998; Allix-Berguec *et al.*, 2004).

Esta metodología se basa en la amplificación de cada *locus* MIRUs con iniciadores dirigidos específicamente a cada *locus*, el resultado de la amplificación de los mismos se visualiza en un gel de electroforesis, el número de repeticiones se calcula en base al tamaño de los productos de amplificación, la variabilidad en la tipificación está dada porque puede haber ausencia de estos *locus*, y por lo tanto no se observan productos de amplificación en *locus* determinados. El número de repeticiones varía de 2 a 8 copias, ocasionalmente pueden ser más de 9 en cada *locus*, pero en ciertas ocasiones no presenta copias (Supply *et al.*, 2006; Van Deutekom *et al.*, 2005).

La metodología MIRU tiene un poder discriminatorio igual o ligeramente menor a RFLP-*IS6110* dependiendo del número de *locus* MIRU que se tengan en cuenta para los estudios, 12, 15 o 24, a mayor número de *locus*, mayor poder discriminatorio (Allix-Berguec *et al.*, 2008). Actualmente se considera técnica *Gold standard* para la genotipificación de *M. tuberculosis*.

Este estudio relacionado a epidemiología molecular de MTB es el primero en utilizar 24 MIRUs en nuestro país. También se reporta la investigación realizada por Niyaz *et al.* (2003), quienes utilizaron marcadores FLAP para pacientes con y sin VIH en el Perú, y describieron los datos que evidencian la diversidad genotípica de cepas naturales de MTB de estos pacientes, y concluyeron que el tipo de cepa identificada



en este estudio puede estar circulando en otras ciudades de Perú entre los jóvenes móviles con infección VIH-1.

Taype *et al.* (2012), presentan la primera evaluación de la epidemiología molecular de MTB en el Perú, caracterizando 323 cepas usando *Spoligotyping* y MIRU-VNTR. Su objetivo fue determinar los niveles de diversidad genética y la diferenciación genética dentro y entre los aislamientos peruanos y los factores epidemiológicos que pueden ser modelos de estructura de la población y la evolución de MTB en el Perú. Los resultados muestran que las principales familias de MTB presentes son América Latina – Mediterráneo (LAM), Haarlem, T, y Beijing.

Barletta *et al.* (2013), identificaron la circulación de linajes predominantes de MTB en la población sin factores de riesgo conocido para TB-MDR de San Juan de Lurigancho, que es una zona de alta incidencia, utilizando MIRU 15 y *Spoligotyping*, en el cual se investigó la relación entre los linajes, los patrones de resistencia a los medicamentos primarios y la edad. El linaje encontrado más prevalente fue Haarlem (29,6 %), seguido por T (15,6 %), Beijing (14,1 %), LAM (12,6 %) y Uganda (5 %). A diferencia de otros países latinoamericanos, donde el linaje LAM es el más predominante, aquí se reporta el linaje Haarlem como el más común.

Sheen *et al.* (2013), describen los genotipos de pacientes de la comunidad y VIH coinfectados con tuberculosis pulmonar en Lima; así como, su relación con la resistencia a antibióticos de primera línea utilizando *Spoligotyping*. Aquí se realizó un análisis filogenético y análisis epidemiológico permitiendo identificar clúster y la exploración de asociaciones *spoligotype* con resistencia a los medicamentos, donde se encontró que dos *spoligotypes* se asociaron con MDR especialmente entre los pacientes con VIH. Estos datos sugieren la presencia de un brote clonal prolongado en el hospital estudiado entre pacientes VIH-MDR; sin embargo, no se concluye que

exista una afinidad de cepa específica a la adquisición de resistencia que le confiera la presencia de mutaciones.

Recientemente, Cáceres *et al.* (2014) realizaron la genotipificación de un total de 142 cepas de MTB extremadamente resistente (XDR) utilizando las técnicas *Spoligotyping* y MIRU-15 (15 *loci* Unidad repetitiva intercaladas de micobacterias). A diferencia con otros países de Latina donde el linaje LAM es el más predominante, se encontró que Haarlem es el más común, seguido del linaje T entre las cepas XDR en el Perú.

## **II.6. Ventajas en los métodos de genotipificación**

El *Spoligotyping* sobreestima la frecuencia de transmisiones recientes de *M. tuberculosis* ya que al encontrarse agrupados dos aislamientos sugieren que la transmisión se dio en un corto periodo, o cuando se encuentran dos aislamientos agrupados con largos periodos de diferencia en tiempo se habla de una reactivación endógena o infección crónica; las propiedades evolutivas del *Spoligotyping* le confieren una hipo-variabilidad, manteniéndolo estable durante largos periodos de tiempo, por esto se utiliza como primer método de discriminación ya que su reloj biológico es lento mientras que MIRU-VNTR posee un reloj biológico más rápido que permite diferenciar más eficientemente cepas agrupadas por la metodología previa (Savine *et al.*, 2002).

MIRU-VNTR permite identificar casos donde pacientes que no presentan ningún otro vínculo epidemiológico, presentan el mismo patrón de genotipificación; lo cual sugiere el reporte de algún tipo de contaminación cruzada en el laboratorio. Siendo ésta una de las grandes ventajas ofrecidas por esta técnica, ya que de aplicarse rutinariamente se podrían identificar rápidamente estos casos, evitando sus consecuencias tales como el suministro de un tratamiento antituberculosis a pacientes falsamente diagnosticados y el aumento de costos en salud al administrar un tratamiento costoso

ineficiente. En el estudio realizado por Allix-Berguec *et al.* (2008) encontraron que en un laboratorio en Bélgica se diagnosticaron seis pacientes con tuberculosis, lo cual llamó la atención ya que Bélgica es un país con una muy baja incidencia de tuberculosis, al genotipificar por MIRU-VNTR se dieron cuenta que cuatro de estos pacientes tenían el mismo genotipo y al correlacionar los resultados con los hallazgos de la historia clínica concluyeron que solo tres de los seis pacientes tenían en realidad tuberculosis, siendo la detección de contaminación cruzada en el laboratorio otra de las grandes bondades ofrecidas por esta técnica. (Allix-Berguec *et al.*, 2004, Allix-Berguec *et al.*, 2008).

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **III.1 Hipótesis**

La técnica molecular 24 MIRU-VNTR tiene poder discriminativo para determinar los linajes circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* en una región con alta incidencia y permite hacer asociaciones entre éstos y la resistencia a drogas antituberculosas de primera línea, así como su transmisibilidad y clonalidad.

#### **III.2 Objetivos**

##### **III.2.1 General**

- Identificar los linajes de MTB en la Región Callao utilizando la metodología MIRU-VNTR y determinar su asociación a la resistencia a drogas antituberculosas de primera línea, transmisión y clonalidad.

##### **III.2.2 Específicos**

- Determinar las características epidemiológicas de linajes circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* de la Región de estudio.
- Correlacionar los resultados de linajes con perfil de resistencia a las drogas antituberculosas de primera línea.
- Determinar el porcentaje de genotipos agrupados y el porcentaje de genotipos con patrones únicos de TB para descartar o comprobar casos de transmisión reciente.



## **IV.2. Criterios de selección**

### **Criterios de inclusión**

Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidas de pacientes con tuberculosis pulmonar en la Región Callao.

### **Criterios de exclusión**

- Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de tuberculosis no pulmonar.
- Cultivos contaminados durante el período de incubación y/o proceso.

### **Criterios de eliminación**

Muestras insuficientes para el desarrollo de técnicas moleculares.

### **Universo de estudio**

Cepas de MTB aisladas de pacientes con TB de la Región Callao.

### **Universo muestral**

Cepas de MTB aisladas de pacientes con TB de la Región Callao del año 2013.

## **IV.3. Reactivos**

- Buffer 10x (Invitrogen)
- Betaína 5 M
- dNTPs Set (Invitrogen)
- Taq DNA polimerasa Recombinante (Invitrogen)
- Agua deionizada libre de DNasa/RNasa, grado PCR [dH<sub>2</sub>O].
- MgCl 50 mM (Invitrogen)

- Primers Forward y Reverse, los iniciadores para cada uno de los *loci* MIRU se muestran en el **Anexo I**.
- KAPA Universal DNA Ladder (100 ng/μL) (KAPA BYOSISTEM)
- 6X KAPA DNA Loading Dye (KAPA BYOSISTEM)
- Bromuro de Etidio (0.7μg/mL).
- Buffer TAE 1X
- Agarosa (Invitrogen)
- Etanol al 70 %

#### **IV.4. Software**

El programa Microsoft Excel 2010 para Windows será utilizado para realizar el análisis descriptivo de la población de estudio y los análisis bivariados. El portal de Internet VNTR Plus: <http://www.miru-vntrplus.org/> y programa Mega 5 se utilizaron para la construcción de los dendrogramas y así se obtuvo la cantidad de patrones únicos y agrupados usando los genotipos obtenidos por MIRUs-VNTR.

#### **IV.5. Métodos**

**Procedimientos de colección y/o recolección, procedimientos de desarrollo y/o experimentación, procedimientos de análisis e interpretación de resultados**

##### **IV.5.1. Muestra**

Estuvo compuesta por 133 DNAs de *M. tuberculosis*, aislados de la Región Callao proporcionados por la Red DIRESA CALLAO, provenientes de diferentes centros hospitalarios y penal de la ciudad del año 2013. Las cepas fueron seleccionadas de acuerdo a la disponibilidad de variables clínicas, y a la efectiva recuperación de DNA a una concentración mayor igual a 10 ng/μL, bajo estos criterios se escogieron 133 DNAs los cuales cumplieron con los requerimientos exigidos.

#### IV.5.2. Genotipificación

**Caracterización de aislados de *M. tuberculosis* por la amplificación de los MIRU-VNTR.** La caracterización por MIRU-VNTR se realizará conforme a la técnica reportada por Supply y colaboradores (2006); esta técnica utiliza 24 pares de iniciadores que amplifican cada uno de los 24 *loci* génicos MIRU de mayor variabilidad; los nombres y sus secuencias se señalan en el **Anexo I**. Las reacciones de PCR serán individuales, cada reacción se llevará a cabo en un volumen de 20  $\mu$ L. Los componentes y volúmenes de la PCR estandarizados para cada *locus* se muestran en el **Anexo II**. Se incluirá como un control de la reacción DNA proveniente de la cepa de referencia H37Rv, la cual es una cepa pansensible a las drogas antituberculosas.

De esta manera se llevarán a cabo 24 reacciones de PCR para cada cepa con un programa de amplificación que se muestra en la **Tabla 1**.

**Tabla 1:** Ciclos de temperatura para amplificación (Supply et al., 2006).

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
<b>1X Denaturación inicial</b>	95 °C	15 min
<b>40X Denaturación</b>	95 °C	1 min
<b>Hibridación</b>	59 °C	1 min
<b>Extensión</b>	72 °C	1.5 min
<b>1X Extensión final</b>	72 °C	10 min

Una vez concluida la PCR, los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % durante 1.5 horas a 160 V, al producto se le agregó 2  $\mu$ L de buffer de carga *loading Dye* (KAPA BIOSYSTEM). Se empleó como solución de corrida TAE 1X. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb *Kapa Universal ladder* (KAPA BIOSYSTEM) (**Anexo III**). Se colocaron 8  $\mu$ L de muestra y 6  $\mu$ L de

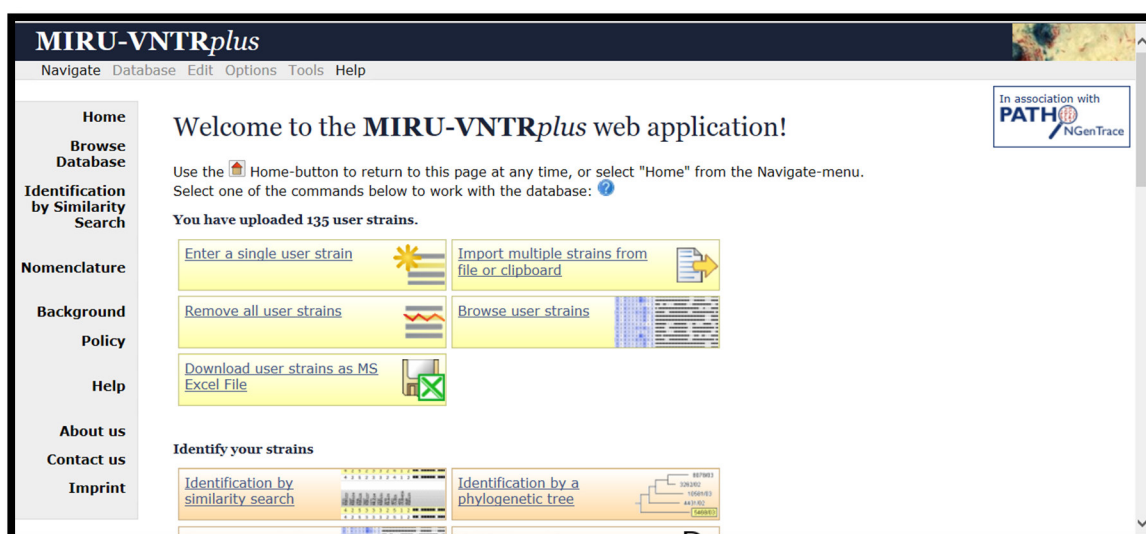


marcador de peso molecular. Para luego teñir el gel con bromuro de etidio a una concentración de 0.7 µg/mL. Posteriormente el gel se visualizó en un transiluminador de luz UV a una longitud de onda de 302 nm. Se utilizó como control positivo las bandas provenientes de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv.

#### IV.5.3. Análisis e interpretación de resultados

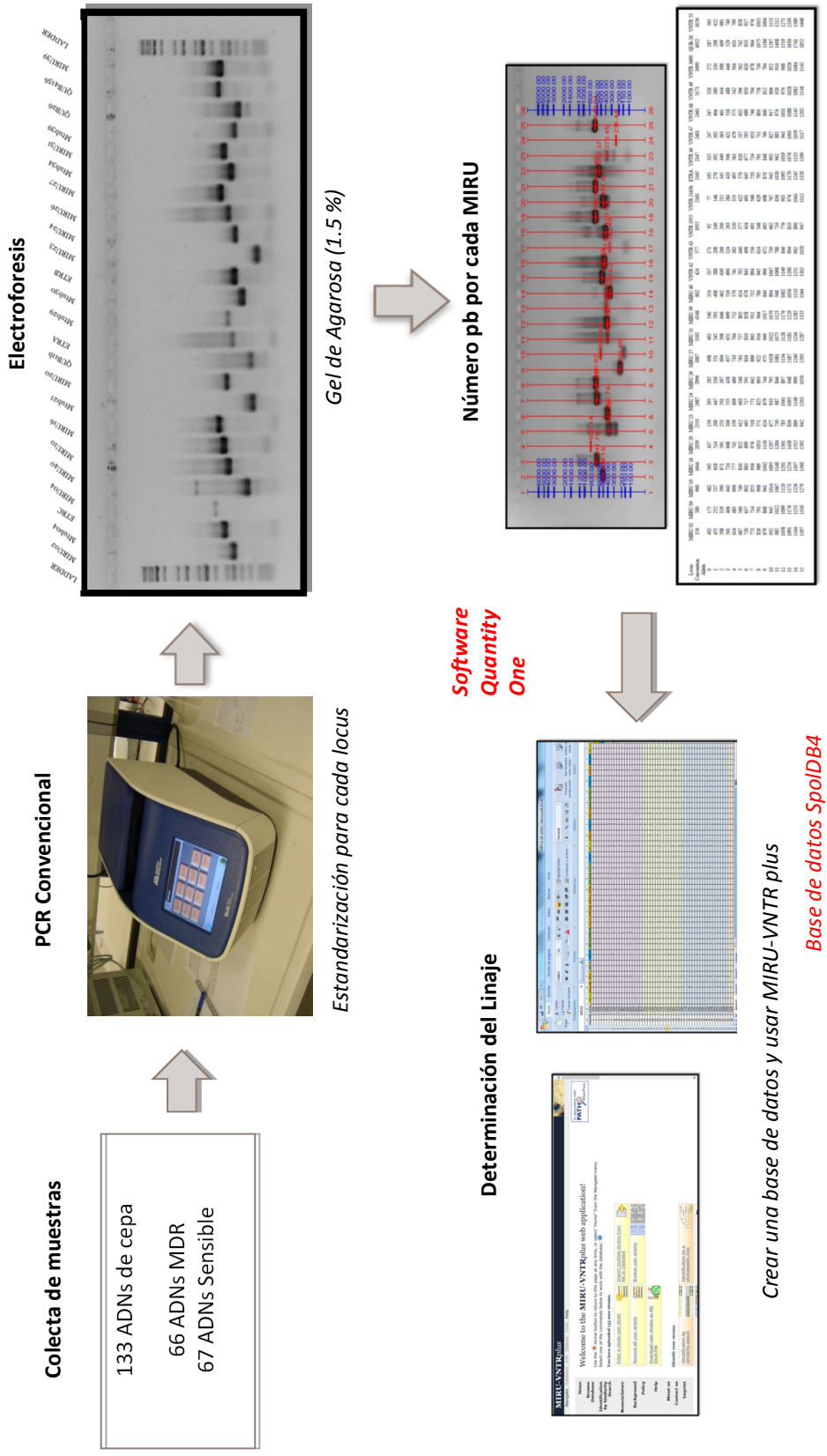
Para determinar el número de repeticiones alélicas de cada MIRU, las bandas obtenidas se compararon con el marcador de 100 pb (Kapa Biosystem, USA). Así mismo, utilizando el *software* del fotodocumentador Chemidoc XRS (BIORAD) se obtuvieron los pesos en pares de bases (pb) de cada microsatélite. Finalmente se calculó el número de repeticiones alélicas comparando los pesos obtenidos con una tabla de número de copias de MIRUs elaborada por Supply *et al.* (2006) (**Anexo IV**).

Los resultados obtenidos para cada MIRU se consignaron en una base de datos en hojas de cálculo de Excel. Para determinar los linajes de MTB, se hizo uso de la herramienta disponible en internet: MIRU-VNTRplusHome-Page <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces> (**Figura 6**), elaborando un dendrograma mediante un análisis de similitud.



**Figura 6:** MIRU-VNTRplus Home-Page, herramienta útil para determinar los linajes de *Mycobacterium tuberculosis*.

El poder discriminatorio se calculó utilizando el Índice Discriminatorio de Hunter Gaston, el cual determina qué tan adecuada es una metodología de genotipificación para reconocer como diferentes dos aislados sin relación epidemiológica. Se realizó una base de datos en EXCEL con variables clínicas y epidemiológicas de los pacientes tales como edad, género, lugar de procedencia de la muestra (Centro Hospitalario), año de aislamiento, patrón de resistencia a drogas antituberculosas y resultado de patrón MIRUs-VNTR, para realizar los análisis bivariados utilizando el Software Microsoft Excel para Windows 7. El resumen metodológico se puede observar en la **Figura 7**.



**Figura 7:** Diagrama metodológico para la genotipificación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando 24 MIRU-VNTR.

## V. RESULTADOS

### V.1. Estudio epidemiológico de la tuberculosis

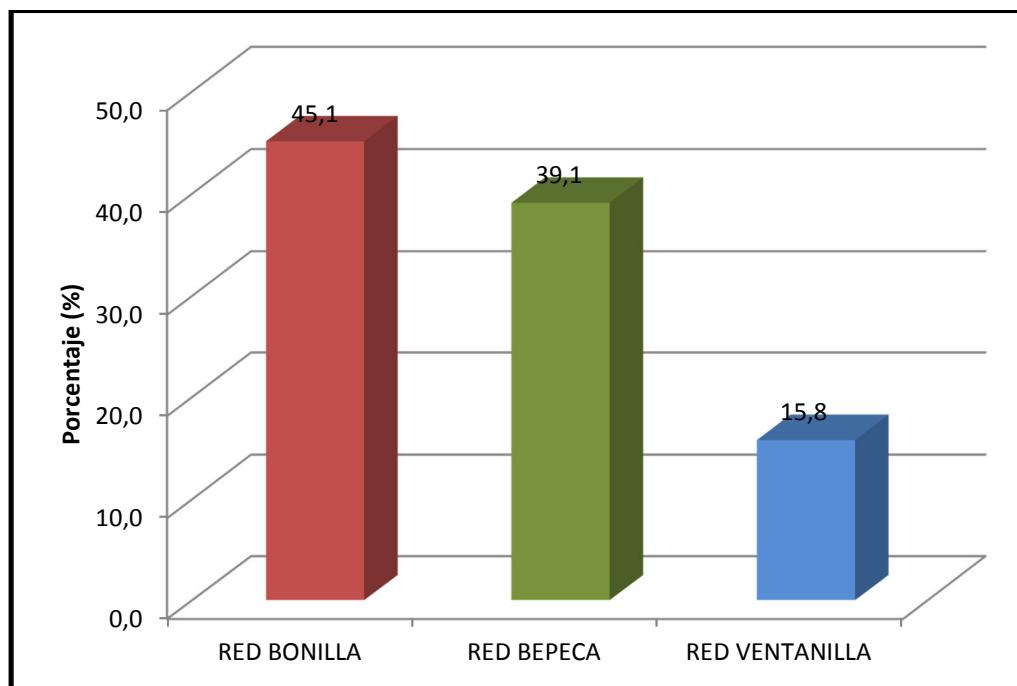
#### Descripción de la población en estudio

La Región Callao tiene una población de 876 877 habitantes, dato reportado en el Censo Nacional del 2007 (INEI, 2007). La población en estudio fue de 133 personas diagnosticadas con TB pulmonar en el año 2013 que residen en la Región Callao, los cuales fueron conformados de 72.2 % (96) pacientes varones y 27.8 % (37) mujeres infectadas con TB. Se determinó que del total de enfermos el 51.1% era menor de 30 años, 38.3 % entre 30 y 60 años y el 10.5 % eran mayores de 60 años (**Tabla 2**).

**Tabla 2:** Frecuencia del sexo y edad de la población.

	Nº de pacientes	Porcentaje (%)
Masculino	96	72.2
Femenino	37	27.8
<b>Total</b>	<b>133</b>	<b>100.0</b>
<=30	68	51.1
30<- <=60	51	38.3
>=60	14	10.5
<b>Total</b>	<b>133</b>	<b>100.0</b>

La distribución de los pacientes en el estudio epidemiológico se dio en base a sus lugares de residencia. Para el análisis visual de la distribución geográfica de los casos, se consideró el establecimiento de salud donde se atendían, el cual fue de la siguiente manera: 45.1 % (60) de la Red Bonilla, 39.1 % (52) de la Red BEPECA y 15.8 % (21) de la Red Ventanilla (**Figura 8**).



**Figura 8:** Distribución de pacientes según la Red de Salud donde se atendieron.

### Susceptibilidad a drogas antituberculosas

La recolección de datos de los resultados de susceptibilidad antimicrobiana (**Tabla 3**) demostró que 50.4 % (67) eran sensibles a todas las drogas y 49.6 % (66) eran MDR.

**Tabla 3:** Frecuencias de los tipos de resistencia a drogas de las cepas.

	Nº de pacientes	Porcentaje (%)
Sensibles	67	50.4
MDR	66	49.6
<b>TOTAL</b>	<b>133</b>	<b>100.0</b>

Los niveles de resistencia (**Tabla 4**) reportados fueron de 49.6 % (66 casos) para isoniacida, 49.6 % (66 casos) para rifampicina, 26.3 % (35 casos) para ethambutol, 27.8 % (37 casos) para estreptomycin, 12 % (16 casos) para etionamida, 3 % (4 casos) para kanamicina, 1.5 % (2 casos) para PAS, 5.3 % (7 casos) para ciprofloxacina, 7.5 % (10 casos) para capreomicina, 1.5 % (2 casos) para cicloserina y 24.1 % (32 casos) para pirazinamida.

**Tabla 4:** Frecuencia de resistencia a drogas antituberculosas en la población de estudio de la Región Callao.

Droga antituberculosa	Nº de	
	pacientes	Porcentaje (%)
Isoniacida	66	49.6
Rifampicina	66	49.6
Ethambutol	35	26.3
Estreptomina	37	27.8
Etionamida	16	12.0
Kanamicina	4	3.0
P- ácido aminosalicílico	2	1.5
Ciprofloxacina	7	5.3
Capreomicina	10	7.5
Cicloserina	2	1.5
Pirazinamida	32	24.1
<b>TOTAL PACIENTES</b>	<b>133</b>	<b>100.0</b>

### **Casos MDR**

De los 66 pacientes con multidrogorresistencia, 72.7 % (48) corresponden al sexo masculino y 27.3 % (18) al sexo femenino, cuyas edades oscilaban entre los 16 y 79 años. Se registró la ubicación de sus lugares de residencia dentro de la Red Bonilla (56.1 %), Red BEPECA (33.3 %) y Red Ventanilla (10.6 %) (**Tabla 5**).

**Tabla 5:** Frecuencias y porcentajes de los casos MDR.

		SEXO		EDAD			RESIDENCIA		
				Menor		Mayor	R.	R.	R.
		M	F	a 30	30 - 60	a 60	Bonilla	BEPECA	Ventanilla
MDR	Frec.	48	18	35	27	4	37	22	7
	%	72.7	27.3	53.0	40.9	6.1	56.1	33.3	10.6

*Frec.: Frecuencia*

Los mayores porcentajes de casos MDR pertenecen a pacientes menores de 30 años y a los residentes de la Red Bonilla.

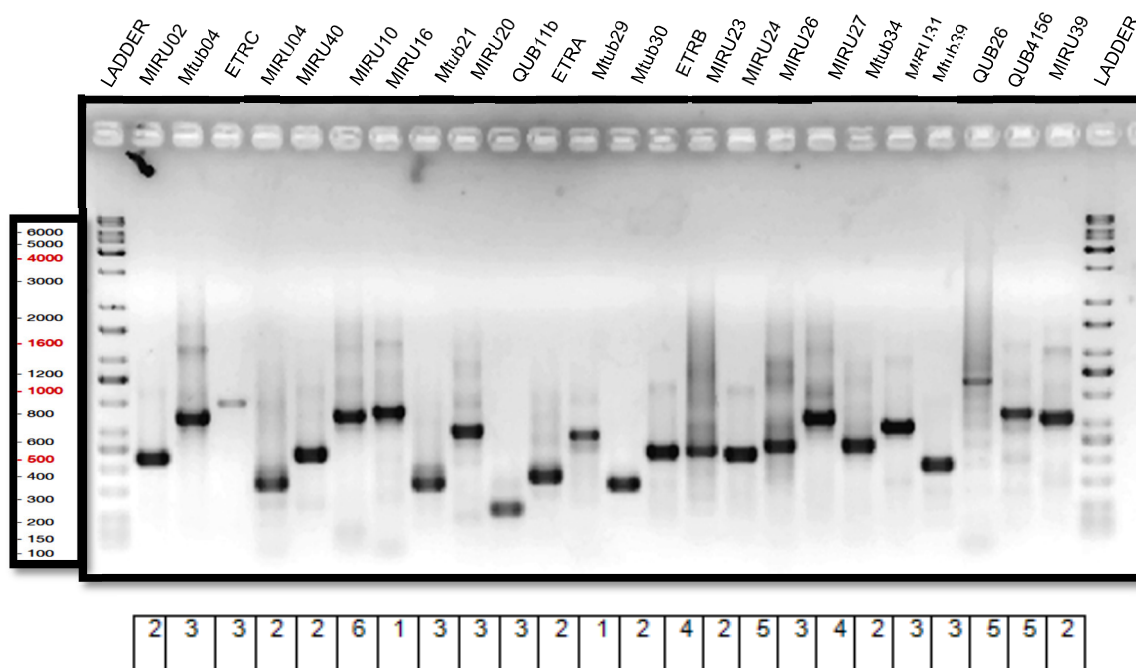
## V.2. Estudio molecular de transmisión de tuberculosis

### Evaluación y Cuantificación del DNA genómico

La extracción de DNA a partir de cultivos de *M. tuberculosis* se realizó utilizando el kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen). En las 133 cepas estudiadas se diluyó a 10 ng/μL aproximadamente la concentración inicial de DNA de todas las muestras, medida a una absorbancia de 260/280 nm (**Anexo V**), se realizó la cuantificación utilizando el equipo Nanodrop 800.

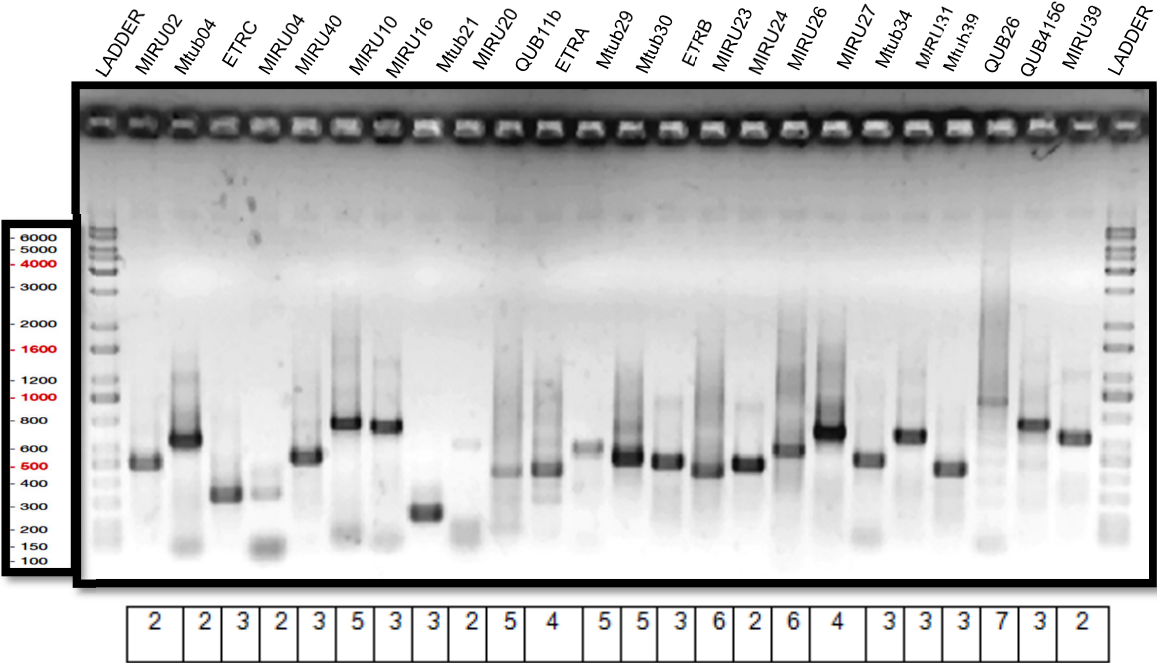
### Análisis de Genotipaje basado en 24 MIRU-VNTR

En cada electroforesis se consideró a la cepa H37Rv como control interno de las muestras (**Figura 9**).



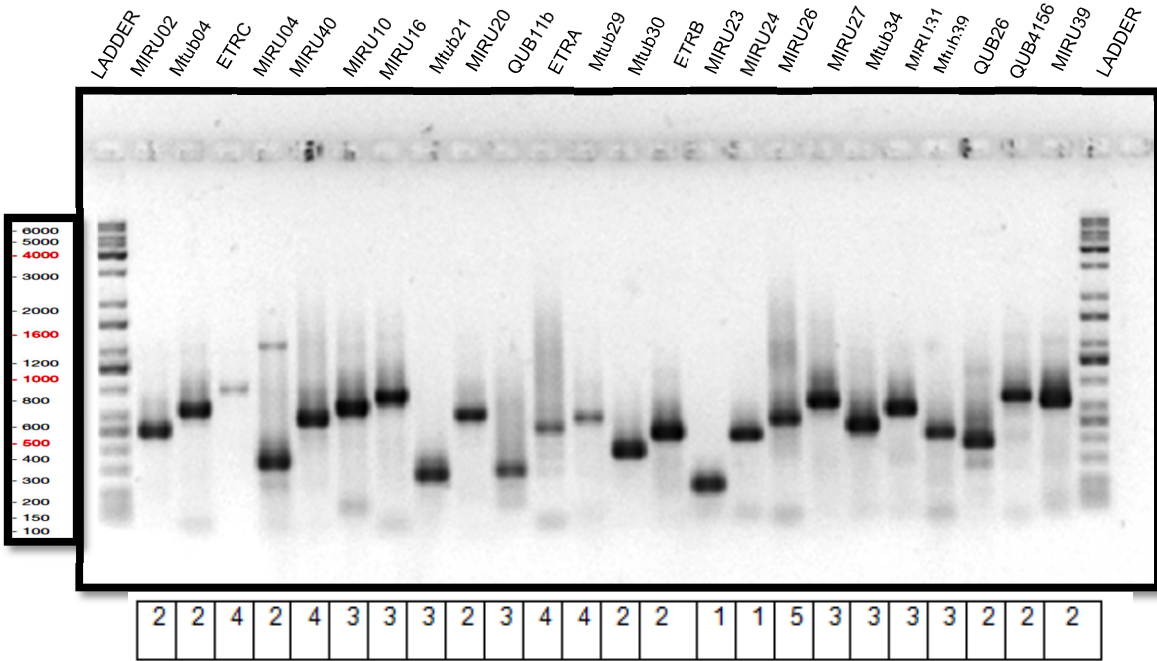
**Figura 9:** Electroforesis de MIRU-VNTR de 24 loci de la cepa H37Rv.

Se realizó el MIRU-VNTR de 24 *loci* para las 133 cepas de *M. tuberculosis* de la Región Callao. En la **Figura 10** se muestra el patrón completo de MIRU-VNTR para la cepa 6358/13, cuyo fenotipo corresponde a una cepa pansensible; además se muestra en la parte superior de la figura la identificación de cada *locus*.



**Figura 10:** Electroforesis de MIRU-VNTR de 24 loci de la cepa 6358/13.

En la **Figura 11** se muestran los patrones de MIRU-VNTR de la cepa 2212/13 de *M. tuberculosis* MDR.

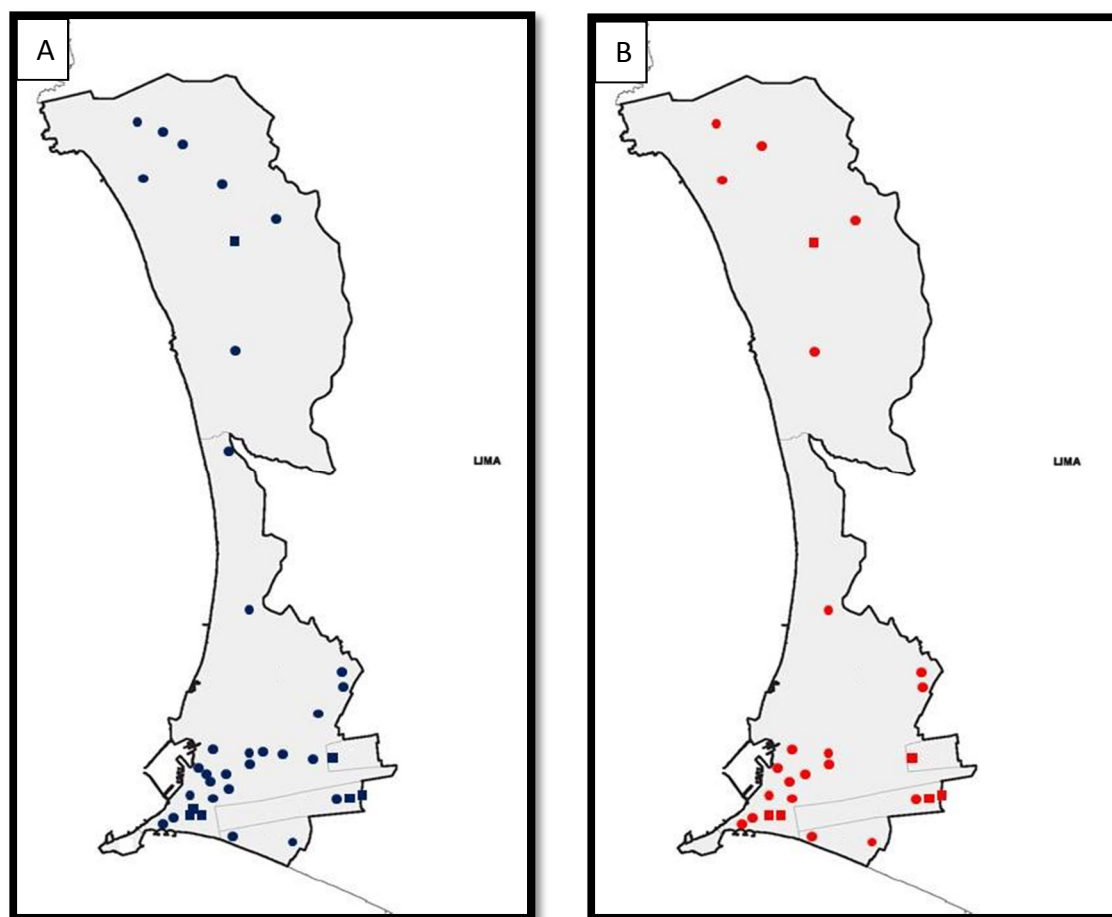


**Figura 11:** Electroforesis de MIRU-VNTR de 24 loci de la cepa 2212/13.



## Distribución geográfica de los agrupamientos de procedencia

En todos los centros de salud estudiados se encontró diversos linajes, observándose en la mayoría de los agrupamientos la presencia de pacientes que pertenecían a distintas Redes de Salud, relación epidemiológica planteada como un supuesto a ser estudiado. Un caso contrario fue lo que se observó en 7 agrupamientos de dos aislados cada uno, compuestos por pacientes que se atendían en el mismo centro de salud, correspondiendo uno de ellos a dos hermanos que vivían juntos (7167/2013 y 7317/13). Como se mencionó, los pacientes provienen de las tres Redes de Salud de la Región Callao, los cuales se señalan en la **Figura 12** como posibles focos donde se encuentran estas cepas.



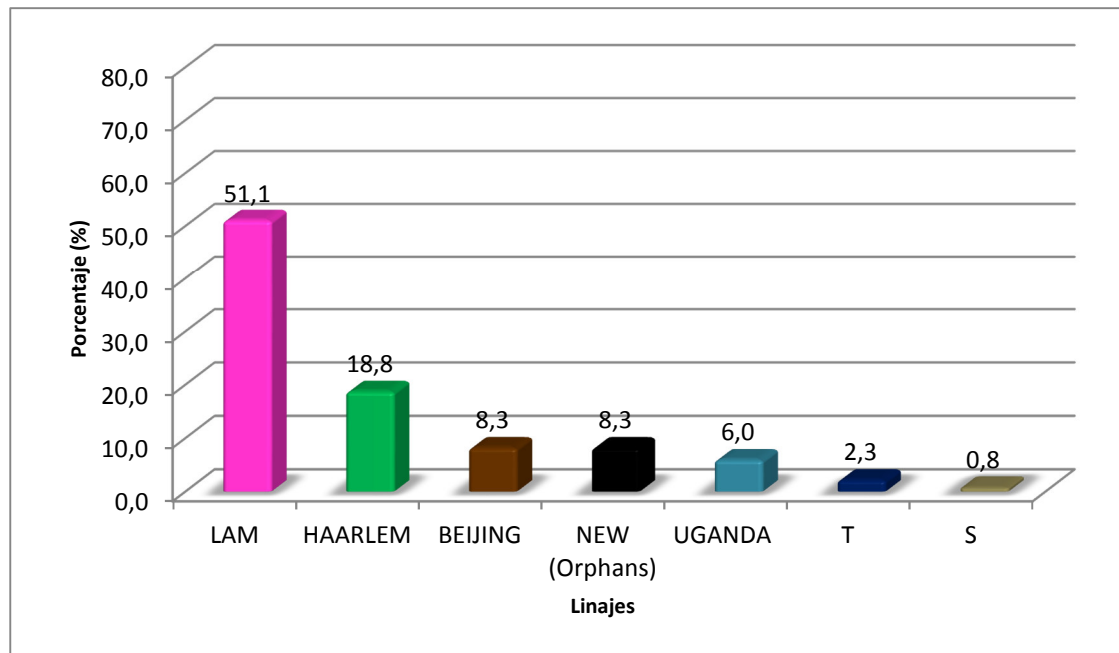
**Figura 12: Distribución geográfica de Centros de Salud y de pacientes MDR.** A: Muestra los lugares de distribución de todos los pacientes estudiados según su centro de salud de referencia. B: Muestra la distribución de los pacientes MDR, siguiendo el criterio anterior. Puntos (Centros de Salud), Cuadrado (Hospitales).

La distribución de las cepas, a pesar de pertenecer a una población relativamente pequeña, cubre gran parte de la Región Callao. En referencia a las cepas MDR, como se muestra en la **Figura 12**, se localizan justo en los lugares con una alta densidad de TB, marcándose con 27 puntos rojos. Dos casos son los más alejados y fueron reportados en el Centro de Salud Luis Felipe de las Casas. La distribución de los perfiles genéticos, como se muestra en el **Anexo VI**, es indiferenciada al lugar de residencia de los pacientes y al lugar de referencia de su centro de salud.

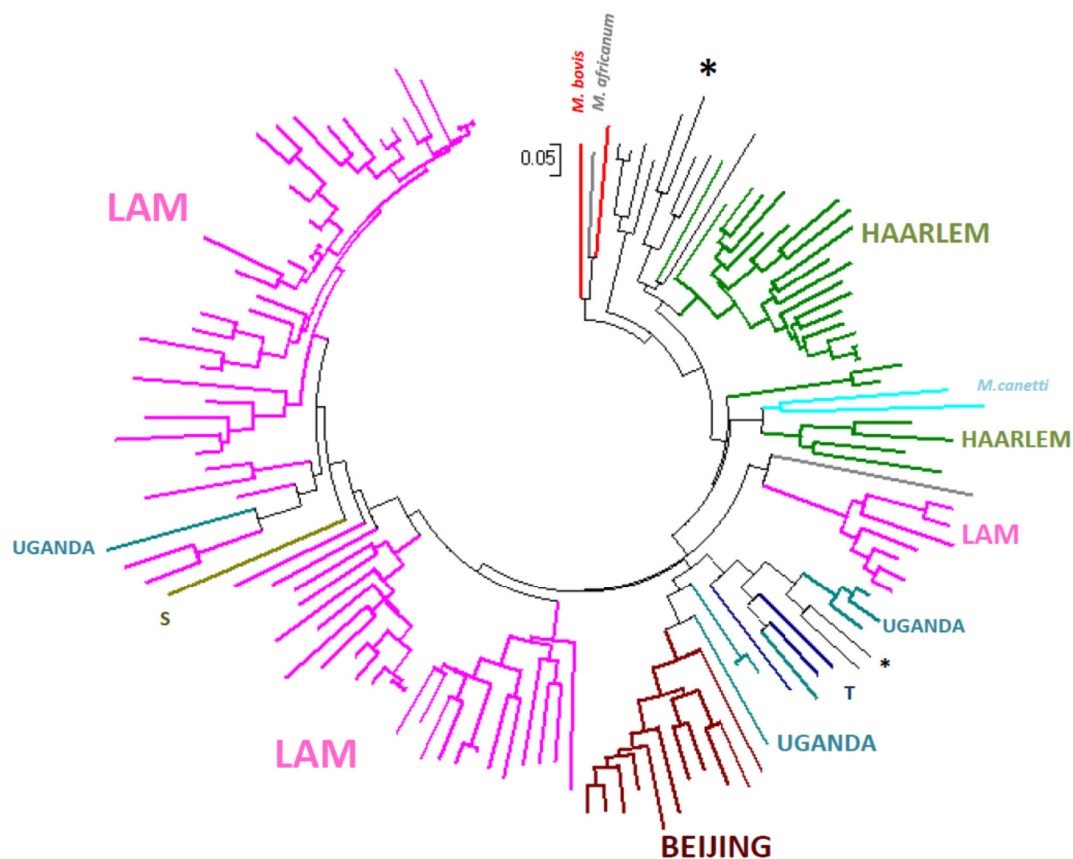
### **Distribución de linajes**

Los patrones de MIRU 24 identificados mediante comparación por distancia genética  $<0.17$ ; es decir, una tolerancia como máximo de 4 *locus* de diferencia para MIRU-VNTR, mostraron en su gran mayoría patrones no agrupables en algún linaje (81.2 %), mientras que los restantes (18.8 %), se agruparon en el linaje LAM y Haarlem con 7.52 % cada uno, seguido de Beijing (3.01 %) y Uganda (0.75 %).

La identificación de linajes final se realizó por agrupamiento en árbol filogenético (**Anexo VII**). A partir de la realización de la metodología 24 MIRU-VNTR en los aislados recuperados, los linajes que se observaron con mayor frecuencia fueron el LAM y el Haarlem con el 51.1 % y el 18.8 % de los aislados respectivamente, seguido del linaje Beijing (8.3 %), el 6.0 % de los aislados analizados se caracterizaron dentro del linaje Uganda. Los linajes que se presentaron con menor frecuencia fueron el linaje T (2.3 %) y el linaje S (0.8 %). El 8.3 % de los aislados presentaron patrones MIRU-VNTR que no han sido descritos en la literatura (*Orphans*) (**Figura 13 y 14**).



**Figura 13:** Linajes prevalentes en 133 cepas de *M. tuberculosis* de la Región Callao.



**Figura 14:** Dendrograma basado en distancias obtenidas a partir del análisis de 24 MIRU-VNTR de 133 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de la Región Callao. (Software Mega 5). Con asterisco las cepas Orphans.

### Poder discriminatorio de cada uno de los *locus* MIRUs

La diversidad alélica de cada *locus* VNTR (**Tabla 6**) se evaluó usando el índice de diversidad Nei y clasificándolo según Sola *et al.* (2003). Así se determinó cuáles fueron los *locus* más polimórficos y contribuyeron más a la diferenciación de las cepas estudiadas.

**Tabla 6:** Diversidad alélica MIRU-VNTR en 133 cepas de *M. tuberculosis* de la Región Callao.

LOCUS	DIVERSIDAD	
	ALÉLICA	PODER DISCRIMINATORIO
MIRU 02	0,4	Moderado
MTUB04	0,66	Alto
ETRC	0,71	Alto
MIRU 04	0,04	Pobre
MIRU 40	0,76	Alto
MIRU 10	0,68	Alto
MIRU 16	0,61	Alto
MTUB 21	0,67	Alto
MIRU 20	0,45	Moderado
QUB 11B	0,76	Alto
ETRA	0,59	Moderado
MTUB 29	0,45	Moderado
MTUB 30	0,7	Alto
ETRB	0,44	Moderado
MIRU 23	0,67	Alto
MIRU 24	0,39	Moderado
MIRU 26	0,72	Alto
MIRU 27	0,49	Moderado
MTUB 34	0,63	Alto
MIRU 31	0,64	Alto
MTUB 39	0,65	Alto
QUB 26	0,82	Alto
QUB 4156	0,54	Moderado
MIRU 39	0,22	Pobre

El *locus* más polimórfico; es decir, aquel que mostró mayor variación en el número de alelos, en nuestro estudio fue QUB26 con 10 alelos diferentes, seguido del MIRU 40 y

QUB 11b con 8 alelos diferentes y los menos polimórficos fueron los MIRU 4 y 39 con sólo 2 alelos.

### **Determinación de patrones únicos y agrupados**

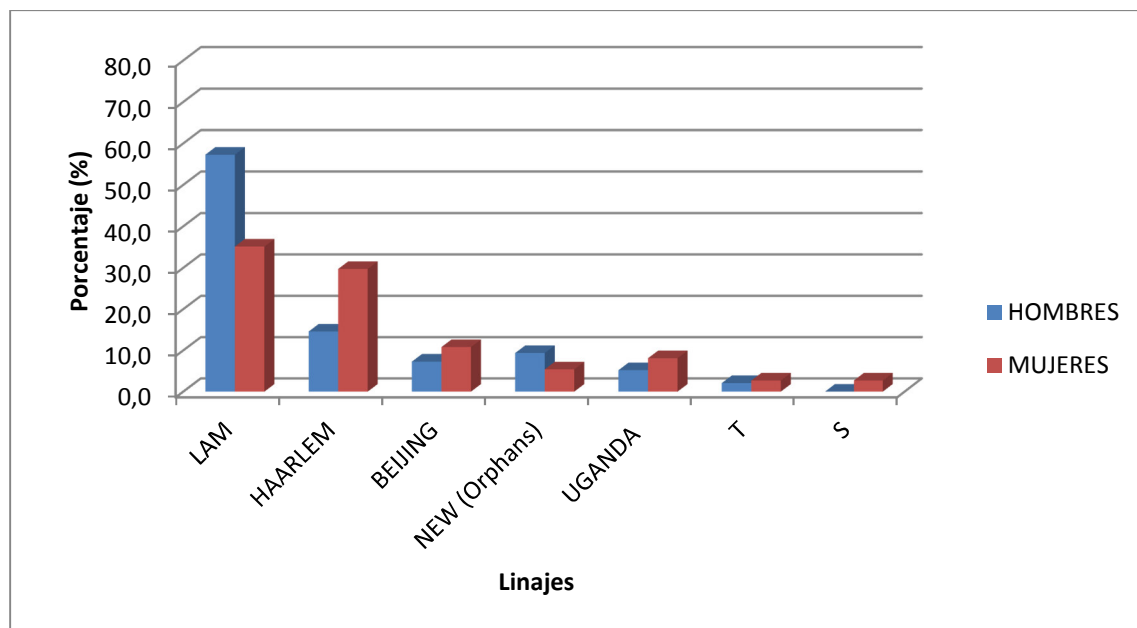
#### **Análisis de Cluster**

Se construyó un dendrograma con el fin de determinar el porcentaje de patrones únicos y cepas agrupadas a partir de los resultados obtenidos con la genotipificación usando MIRUs-VNTR. Se obtuvieron 94 % (125) patrones únicos y 6 % (8) cepas agrupadas en 4 clúster, en grupos de 2 cepas (**Figura 16**).

En esta muestra se obtuvieron 129 genotipos diferentes por medio de la genotipificación por MIRU-VNTR. Posteriormente se analizó cada clúster y se verificó que no existía algún nexo epidemiológico entre las cepas agrupadas, también se les asignaron los linajes correspondientes.

### **Distribución de linajes por sexo del paciente**

La identificación de linajes según el sexo de pacientes muestran que para el sexo masculino y femenino (**Figura 15**), el linaje LAM es el mas prevalente (57.3 y 35.1 % respectivamente), seguido por el linaje Haarlem el cual presenta mayor prevalencia en mujeres (29.7 %) que en varones (14.6 %). El linaje Beijing está presente en mujeres (10.8 %) y varones (7.3 %); para el caso de muestras huérfanas (*orphans*) se reporta en varones (9.4 %) y mujeres (5.4 %). Dentro de los linajes menos prevalentes estan Uganda, T y S para varones con una frecuencia de 5.2 , 2.1 y 0 %, respectivamente; mientras que en mujeres es de 8.1 , 2.7 y 2.7 %, respectivamente.



**Figura 15:** Linajes prevalentes de 133 cepas de *M. tuberculosis* según género de la Región Callao.

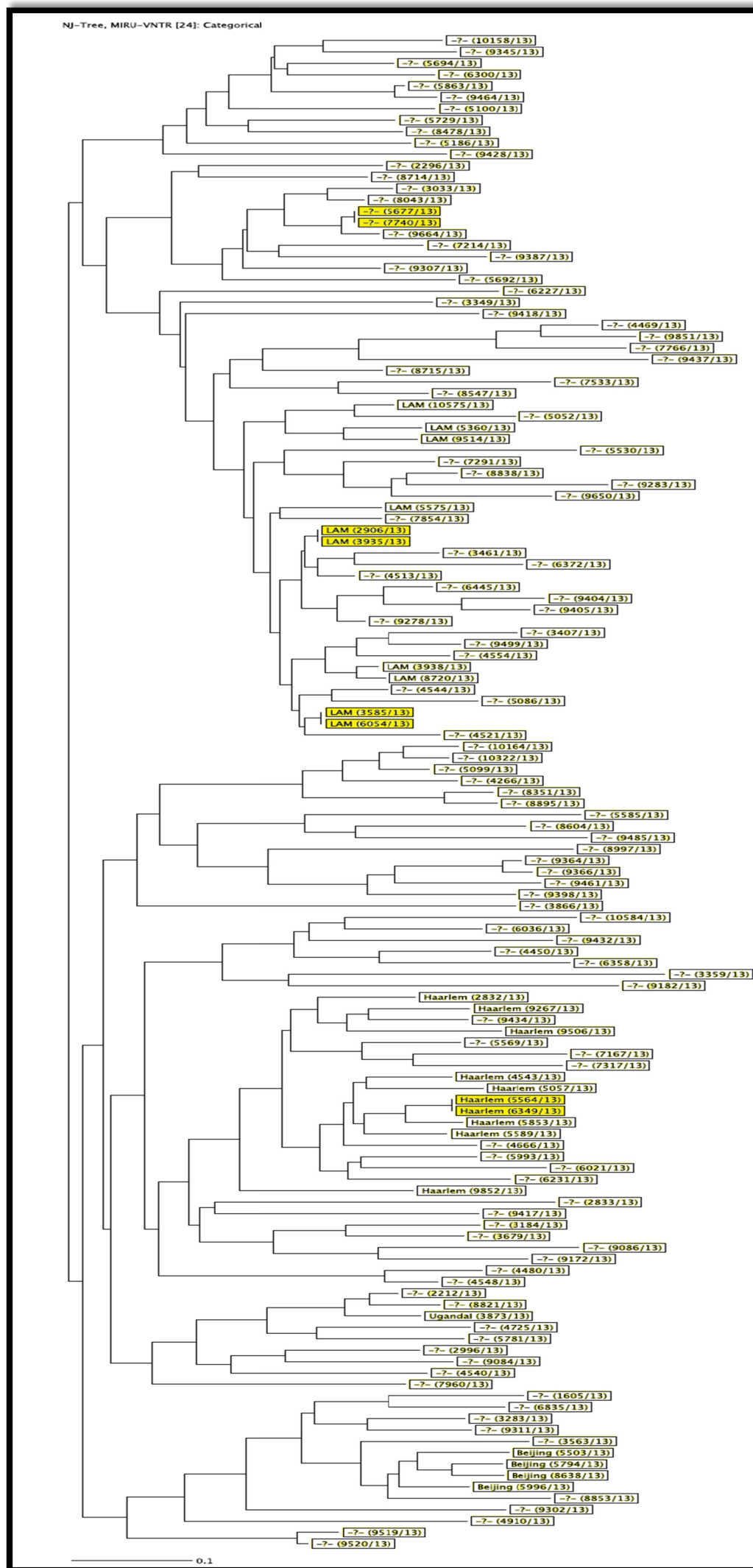


Figura 16: Árbol filogenético Neighbor Joining de 133 cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Determinación de patrones únicos y agrupados.

## **Relación de los linajes identificados y características epidemiológicas de la población**

En el caso del linaje LAM se identificaron 68 aislados de los cuales 46 presentaban resistencia del tipo MDR, la mayoría de los aislados dentro de este linaje se presentaba en pacientes menores de 30 años (40 aislados); así también, de los aislados MDR, 27 eran pacientes menores de 30 años.

De los 25 aislados identificados dentro del linaje Haarlem, se encontró que 7 de éstos eran resistentes a fármacos, específicamente resistencia MDR en todos los casos. La mayoría de los aislados se presentaban en pacientes menores de 60 años (21 aislados); de los MDR, 3 eran aislados de pacientes menores de 30 años, 2 aislados de pacientes entre 30 y 60 años; así como, 2 casos mayores de 60 años.

De los 11 aislados encontrados dentro del linaje Beijing, 4 presentaban tipo de resistencia MDR. Dentro de este linaje se reportaron 5 casos de pacientes menores de 30 años, 4 casos de pacientes entre 30 y 60 años; así como, 2 casos mayores de 60 años. De los aislados MDR, 3 eran pacientes menores de 30 años.

En el linaje Uganda se caracterizaron 8 aislados de los cuales 5 son del tipo MDR. Dentro de este linaje se reportaron 3 casos de pacientes menores de 30 años, 4 casos de pacientes entre 30 y 60 años; así como, un solo caso mayor de 60 años. De los aislados MDR, 4 eran pacientes mayores de 30 años.

Para los linajes con menor frecuencia (T y S) solo se encontraron 3 y 1 casos respectivamente, solo se presentó un aislado MDR para el linaje T. En este linaje se presentó el paciente con la mayor edad (85 años).



Dentro de los 11 aislados huérfanos se identificó el menor número de casos de resistencia a fármacos, reportándose 2 aislados del tipo de MDR. Dentro de los aislados huérfanos se reportaron 5 casos de pacientes menores de 30 años, 4 casos de pacientes entre 30 y 60 años; así como, 2 casos mayores de 60 años. De los MDR, ambos aislados eran de pacientes mayores de 30 años (**Anexo VI**).

### **Estudio Molecular de Cepas Resistentes y Sensibles**

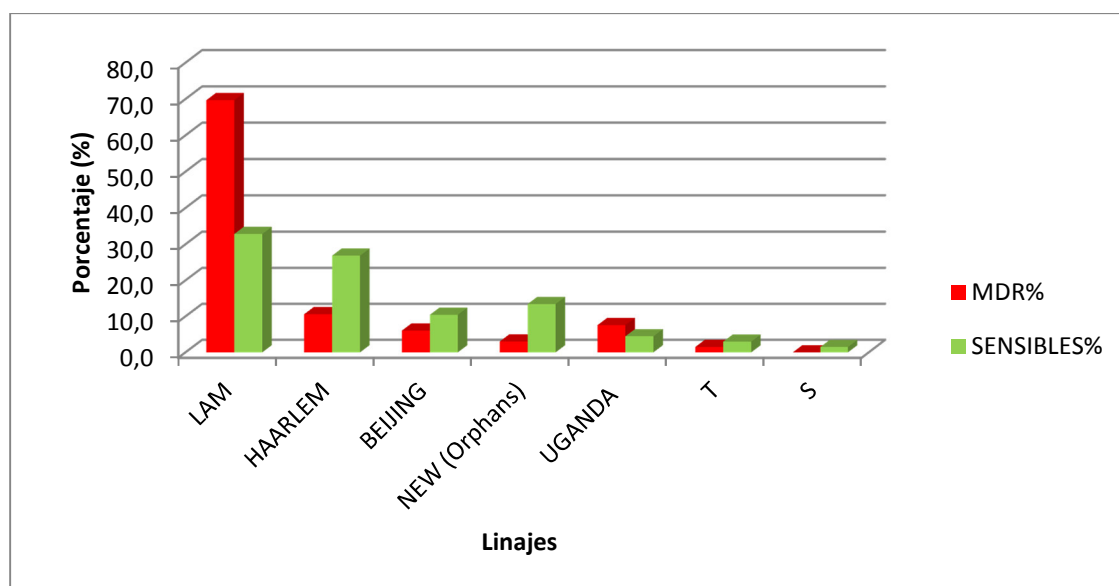
En el estudio comparativo de determinación de linajes presentes entre cepas reportadas como MDR y cepas sensibles (**Figura 17**) se determinó que el linaje LAM es ampliamente prevalente para cepas MDR (69.7 %) en comparación con las cepas sensibles (32.8 %) en las que hay más diversidad de linajes.

El linaje Haarlem es menos prevalente en cepas MDR (10.6 %) en comparación con cepas sensibles (26.9 %). La prevalencia de cepas sensibles para este linaje es comparable a la del linaje LAM antes mencionado.

Para el caso del linaje Beijing se observa que la prevalencia en cepas MDR (6.1 %) y en cepas sensibles (10.4 %) no es significativamente diferente, al igual que el linaje Uganda que muestra una prevalencia de 7.6 % en cepas MDR y 4.5 % en cepas sensibles, no evidenciando una posible relación fenotipo – genotipo.

Para el caso de linajes con menos frecuencias (T y S) se determinó una prevalencia de 1.5 y 0 % respectivamente en cepas MDR; así como, 3 y 1.5 % en cepas sensibles. La única cepa determinada como linaje S fue de tipo sensible.

Dentro de los aislados huérfanos se determinó una menor prevalencia (3 %) de éstos en cepas MDR, en comparación con un 13.4 % en cepas sensibles.



**Figura 17:** Comparación por agrupamiento en un árbol filogenético de 66 cepas MDR y 67 sensibles de *Mycobacterium tuberculosis*.

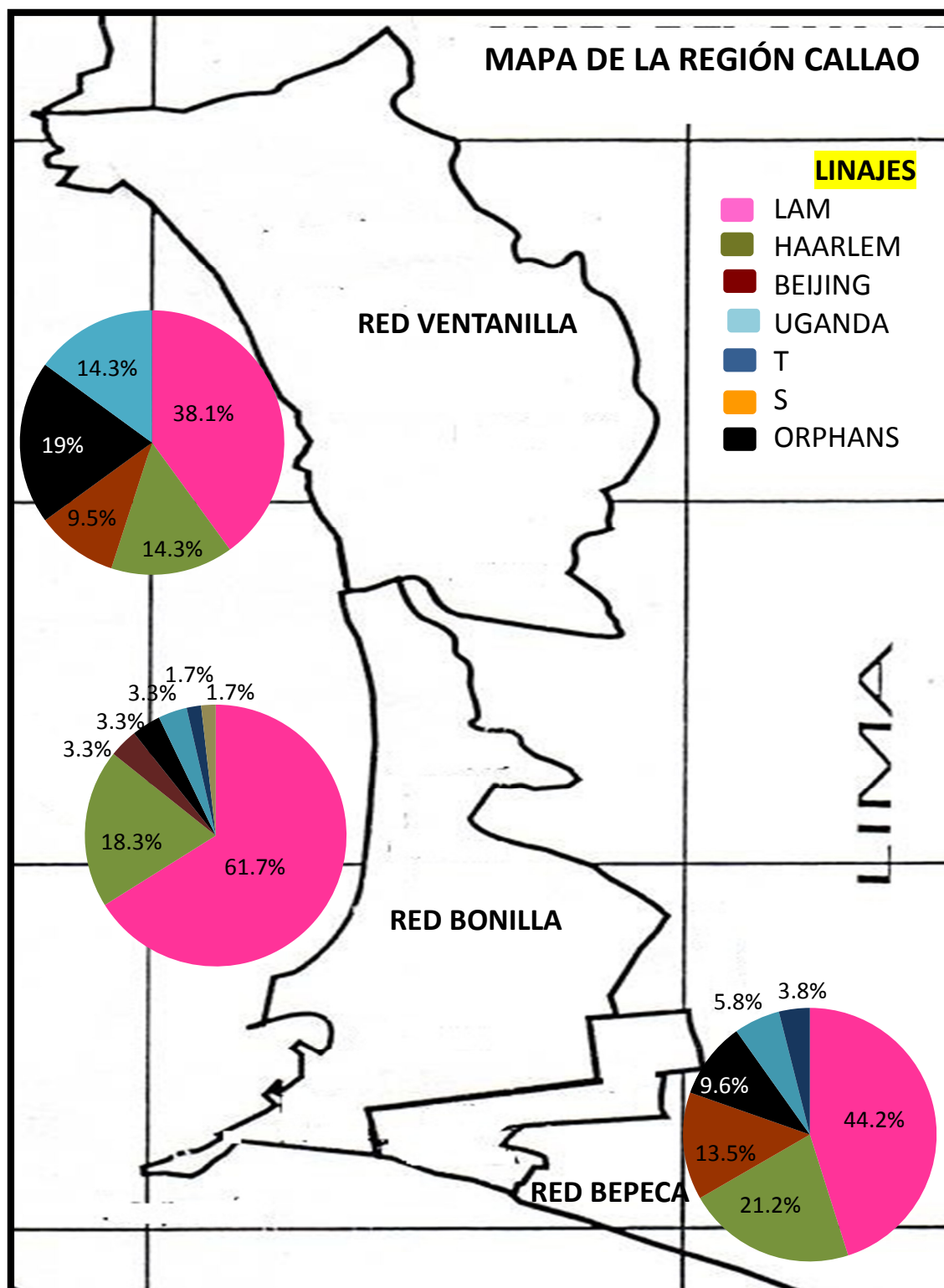
### Estudio Molecular de Cepas MTB por Red de Salud

En el estudio comparativo de identificación de linajes presentes entre aislados pertenecientes a las tres redes de salud del Callao (Bonilla, BEPECA y Ventanilla) (**Figura 18 y 19**), se determinó que el linaje LAM es el más prevalente para las tres Redes (61.7, 44.2 y 38.1 %, respectivamente).

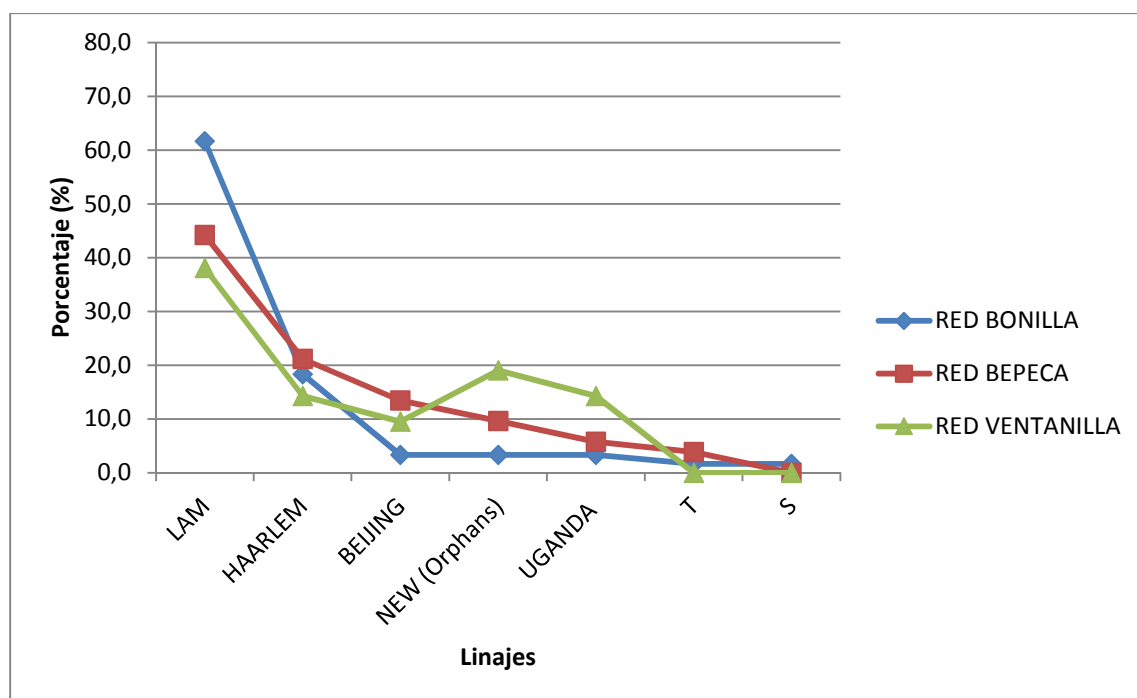
El linaje Haarlem presenta una prevalencia de 18.3, 21.2 y 14.3 % para cada una de la tres Redes (Bonilla, BEPECA y Ventanilla, respectivamente), evidenciándose una distribución estadísticamente similar. Para el caso del linaje Beijing se observa que la mayor prevalencia de cepas se encuentra en la Red BEPECA (13.5 %) y menor presencia (3.3 %) en la Red Bonilla.

El linaje Uganda presenta una prevalencia de 3.3, 5.8 y 14.3 % para cada una de la tres Redes (Bonilla, BEPECA y Ventanilla, respectivamente). Para el caso de los linajes con menos frecuencias, el linaje T no fue reportado en la Red Ventanilla; así como, el linaje S solo fue identificado en la Red Bonilla.

Dentro de los aislados huérfanos se determinó presencia de 2, 5 y 4 aislados respectivamente para cada una de las Redes de Salud.



**Figura 18:** Mapa de la Región Callao mostrando los linajes prevalentes de 133 cepas de *M. tuberculosis* por Red de Salud.



**Figura 19:** Linajes prevalentes de 133 cepas de *M. tuberculosis* por Red de Salud de la Región Callao.

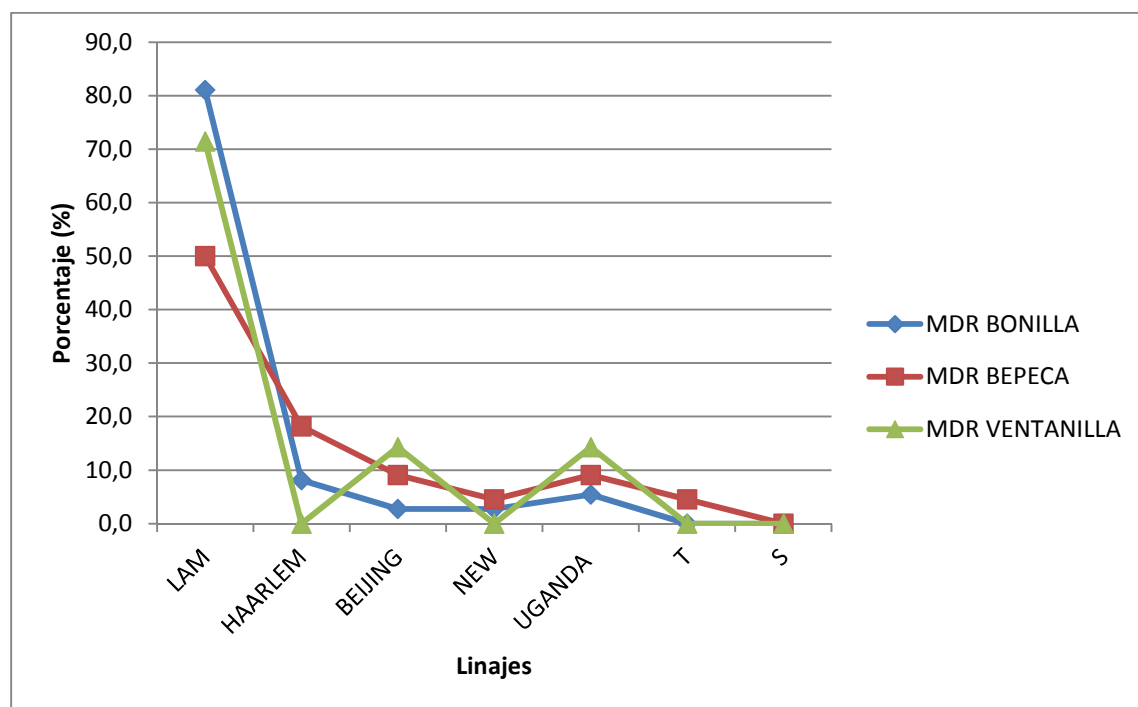
### Epidemiología molecular de cepas MDR TB por Red de Salud

En el estudio comparativo de identificación de linajes presentes entre aislados MDR pertenecientes a las tres redes de salud del Callao (Bonilla, BEPECA y Ventanilla) (**Figura 20**), se determinó que el linaje LAM sigue siendo el más prevalente para las tres Redes (81.1, 50.0 y 71.4 % respectivamente).

El linaje Haarlem presenta una prevalencia de 8.1 y 18.2 % para la Red Bonilla y BEPECA, respectivamente. La Red Ventanilla no reportó casos. Para el caso del linaje Beijing se observa una prevalencia de 2.7, 9.1 y 14.3 % para las redes Bonilla, BEPECA y Ventanilla, respectivamente.

El linaje Uganda presenta una prevalencia de 5.4, 9.1 y 14.3 % para cada una de la tres Redes, respectivamente. Para el caso de linajes con menos frecuencias, el linaje T solo fue reportado en 1 aislado de la Red BEPECA.

Dentro de los aislados huérfanos se identificó dos MDR, uno perteneciente a la Red Bonilla y el otro a la Red BEPECA. No se reportó presencia de cepas del linaje S.



**Figura 20:** Linajes prevalentes de 66 cepas MDR de *M. tuberculosis* por Red de Salud de la Región Callao.

### Relación de los linajes identificados y características epidemiológicas de la población para cepas MDR

#### *Dentro de la Red Bonilla*

En el linaje LAM se identificaron 30 aislados, dentro de este linaje se presentaron pacientes menores de 30 años (16 aislados), entre 30 y 60 años (13 aislados) y mayores de 60 (1 aislado). De los 3 aislados identificados dentro del linaje Haarlem se presentaron 2 aislados en pacientes menores de 30 años y 1 mayor de 30 años. Un solo aislado se reportó como linaje Beijing, con 20 años. En el linaje Uganda se caracterizaron 2 aislados, pacientes con 42 y 59 años. Solo un aislado huérfano se identificó con 73 años de edad.

#### *Dentro de la Red BEPECA*

En el linaje LAM se identificaron 11 aislados, dentro de este linaje se presentaron pacientes menores de 30 años (7 aislados) y mayores de 30 años (4 aislados). De los 4 aislados identificados dentro del linaje Haarlem se presentaron pacientes menores de 30 años (1 aislado), entre 30 y 60 años (1 aislado) y 2 mayores de 60 años. Dos aislados se reportaron como linaje Beijing, uno menor de 30 años y el otro entre 30 y 60 años. En el linaje Uganda se caracterizaron 2 aislados con 29 y 44 años. En el linaje T se identificó un aislado de 35 años de edad. Solo un aislado huérfano se identificó con 43 años de edad.

#### *Dentro de la Red Ventanilla*

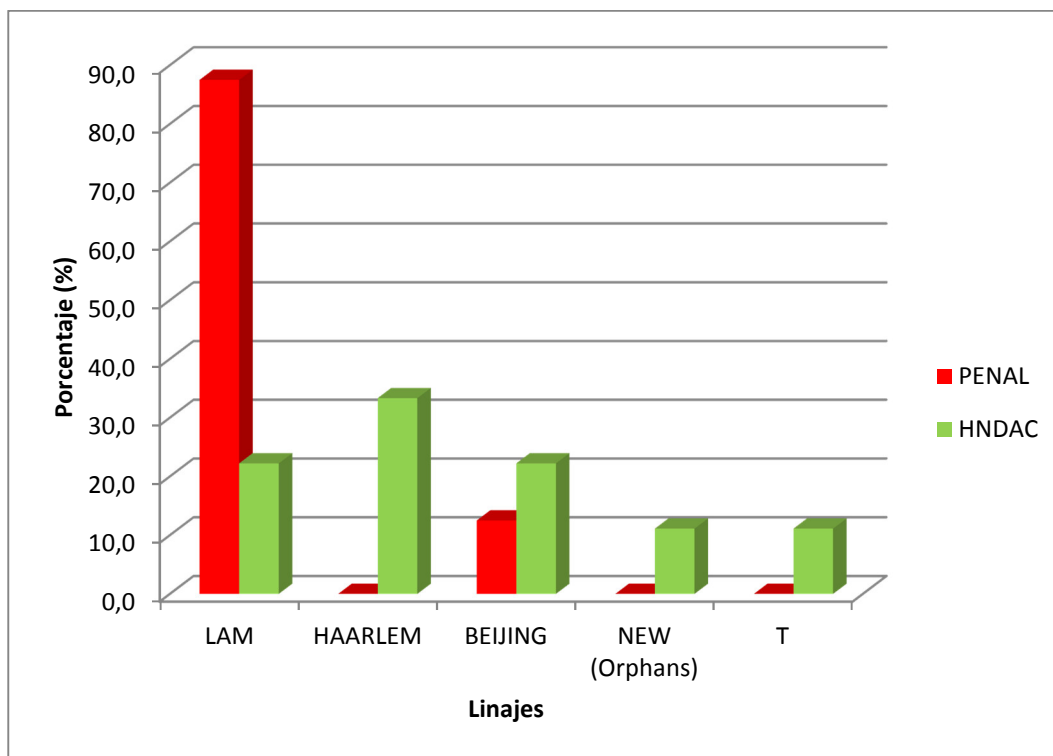
En el linaje LAM se identificaron 5 aislados, la mayoría de los pacientes dentro de este linaje se presentaba en pacientes menores de 30 años (4 aislados). No se reportó aislados en el linaje Haarlem. Un solo aislado se reportó como linaje Beijing, paciente con 28 años de edad. En el linaje Uganda se caracterizó un aislado también, con 39 años. No se reportó aislados Huérfanos.

### **V.3. Estudio comparativo de cepas de circulación fija con cepas de circulación continua**

En el estudio comparativo de determinación de linajes presentes entre 8 cepas MTB provenientes del Penal Sarita Colonia y 9 cepas del Hospital Daniel Alcides Carrión, se determinó que el linaje LAM es el prevalente en cepas del Penal (87.5 %), donde todas las muestras para este linaje se reportaron como MDR, solo un aislado se identificó como linaje Beijing.

En el caso del Hospital Daniel Alcides Carrión se observó una distribución más concordante con los resultados de la genotipificación a nivel de toda la Región de

estudio. El linaje Haarlem es el más prevalente (33.3 %), seguido por LAM y Beijing (22.2 % ambos) y T (11.1 %). Un 11.1 % se reportó como aislado Huérfano (**Figura 21**).



**Figura 21:** Comparación por agrupamiento en un árbol filogenético de 8 cepas MTB provenientes de Penal y 9 cepas MTB de Hospital HNDAC.

#### V.4. Poder discriminatorio de la metodología 24 MIRU-VNTR

El poder discriminatorio del método de genotipificación se calculó por medio del índice discriminatorio de Hunter Ganston (HGDI) (Hunter *et al.*, 1988), utilizando la siguiente fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

Dónde:

N: Número total de aislamientos en el estudio.

S: Número de cluster obtenidos

$n_j$ : Número de cepas por cluster

**Tabla 7:** Poder discriminatorio de 24 MIRU-VNTR en 133 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de la Región Callao.

24 MIRU – VNTR			
Nº Cepas	Nº Clúster	Patrones únicos	HDGI
133	4	129	0.9995

## V.5. Análisis estadístico de los aislamientos agrupados

Para tratar de establecer una asociación entre las diferentes variables y las cepas agrupadas en la muestra de estudio, se realizaron pruebas de Fisher, se utilizó el test exacto de Fisher cuando los valores esperados eran menores a 5 (Juez, 2001). Los resultados se muestran en la **Tabla 8**.

**Tabla 8:** Relación entre agrupamiento con variables clínicas y demográficas.

VARIABLE	AGRUPADO	NO AGRUPADO	VALOR P
<b>Género</b>			
Masculino	46	50	0.1488
Femenino	4	33	
<b>Centro de Salud</b>	19	114	0.0880
<b>Resistencia</b>			
Si	44	22	0.1523
No	36	31	



## **VI. DISCUSIÓN**

### **VI.1. Epidemiología de la tuberculosis en la Región Callao**

Debido a la naturaleza compleja de la historia natural de la tuberculosis los estudios epidemiológicos sobre la transmisión de la enfermedad han sido incompletos y de difícil ejecución. Sin embargo, la implementación de técnicas moleculares para la genotipificación de *M. tuberculosis* ha contribuido de forma importante a la comprensión de las dinámicas de transmisión de este microorganismo.

En este estudio, por primera vez en Perú, se utilizó la técnica de 24 MIRU-VNTR para caracterizar molecularmente cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con tuberculosis pulmonar que reciben atención médica en centros de salud de la Región Callao.

#### **Sobre la población en estudio**

La tuberculosis constituye uno de los principales problemas de Salud Pública en el Perú, siendo reportados en el año 2013 el número total de 9 millones de casos de TB notificados y con una tasa de morbilidad de 126 x 100 000 habitantes, siendo las zonas de mayor incidencia las de Lima y Callao, las cuales notificaron el 54 % de casos de todo el país en el 2012.

En la presente investigación se halló que el 94.3 % de la población enferma estaba dentro de la edad reproductiva, es decir entre los 15 a 55 años, dato que concuerda con la nota pública de la OMS en referencia a la tuberculosis, en la cual señala que esta enfermedad afecta mayormente a personas dentro de la edad productiva en los países subdesarrollados (WHO, 2008), considerando que la población económicamente activa (PEA) en nuestro país refiere un estimado de 15 676 000

personas (INEI, 2007), los cuales se constituyen en una población expuesta a mayores riesgos de infección por sus contactos con otros enfermos sea por motivos de trabajo, educación, transporte, diversión, etc.

### **Sobre la transmisión de la tuberculosis**

Estadísticamente los niveles de transmisión de la tuberculosis dentro del estudio no están asociados con el sexo, edad, lugar de residencia o tipo de resistencia según lo demuestra la **Tabla 8**. Similares resultados se observan en algunos de los trabajos relacionados con la epidemiología molecular de la tuberculosis (Van Soolingen *et al.*, 2001; Foschiani *et al.*, 2002).

Los varones poseen mayor riesgo de contagio que las mujeres, además se reporta que los pacientes menores de 30 años presentan mayor riesgo de contagio que los mayores de 30 años, y este riesgo va disminuyendo conforme aumenta la edad de los pacientes (**Tabla 2**). Estas observaciones son similares a lo reportado en la población general infectada con tuberculosis en América, en los cuales los reportes de tuberculosis publicados por OMS para América señalan que los varones poseen mayor cantidad de casos notificados de infección que las mujeres, además que las edades con mayor riesgo son entre 15 y 34 años de edad.

Los riesgos de infección en relación a los tipos de resistencia encontrados (**Tabla 4**) no poseen una interpretación definida con respecto a los demás parámetros, por lo cual son solo datos referenciales. Es probable una infección mixta de clonas de *M. tuberculosis* en un paciente (Small *et al.*, 1993; Nienman *et al.*, 2000) lo cual se reflejaría en los resultados del riesgo.

### **Sobre la distribución geográfica de las cepas de *M. tuberculosis***

En relación a la **Figura 12 A** se observa un aumento de la dispersión geográfica de las cepas desde el centro de la ciudad hacia las zonas marginales, a diferencia de las distribuciones geográficas reportadas en Estados Unidos (Munsiff *et al.*, 2002) y Colombia (Miranda *et al.*, 2006), dado que en estos países se observa una dispersión geográfica que aumenta desde las márgenes hacia el centro de la ciudad. Similar comportamiento se observa en la distribución de cepas MDR (**Figura 12 B**).

### **Sobre la frecuencia de resistencia a fármacos**

Uno de los grandes problemas en torno a la tuberculosis en el Perú es la presencia de cepas MDR y XDR. El reporte del año 2013 notificó la presencia de 1260 casos MDR, con una morbilidad de 9,6 para cada 100 000 habitantes en el Perú y de las cuales el 11.9 % del total fueron registrados en la Región Callao.

En nuestro país se han notificado desde el año 1997 formas clínicas de tuberculosis XDR, reportándose a la fecha 480 casos, de los cuales las dos terceras partes de pacientes afectados han muerto (MINSA, 2013). Lo cual es resultado de un tratamiento discontinuo que conllevaría al aumento de manera exponencial de las bacterias, y a la aparición por azar de cepas MDR y XDR, que luego son contagiadas a otra persona.

Como se observa la población estudiada presenta un alto porcentaje de cepas *M. tuberculosis* resistentes a fármacos (49.6 %), reportándose todos como MDR (**Tabla 3**), por lo que es posible que la población haya presentado un alto índice de diagnóstico por fracaso de tratamiento o que se haya seleccionado muchas cepas con esta característica en el número de muestras, o también que una población colectada en solo un año ha podido inferir una situación más aguda en cuanto a las resistencias, que en una población de mayor número (Foschiani *et al.*, 2002). Los mayores

porcentajes de cepas MDR pertenecen a las personas menores de 30 años y a los residentes de la Red Bonilla (**Tabla 5**). La existencia de un número alto de cepas *M. tuberculosis* MDR en la Región Callao, coincide con los reportes de la OMS y el Ministerio de Salud del Perú.

La resistencia a rifampicina está a menudo relacionada con la resistencia a isoniácida y a otras drogas, por lo que el estudio de estas características es fundamental en la vigilancia de *M. tuberculosis* MDR (Miranda *et al.*, 2006). Siendo altamente preocupante los altos niveles de resistencia a rifampicina e isoniácida (49.6 %), en una muestra de 1 año, lo que puede significar una alarma para el sistema de vigilancia, los cuales no son reportados por los sistemas de salud actuales, a pesar de existir reportes del Instituto Nacional de Salud en el año 2005 en el que para un total de 2014 muestras analizadas de pacientes con tuberculosis, los porcentajes de resistencia a drogas antituberculosas más altos fueron a Isoniácida, Rifampicina y Estreptomina, y los porcentajes aumentaron cuando se reportaron interacciones de resistencia entre ellas; así también, algunas muestras presentaron resistencia hasta a cinco drogas antituberculosas. Para este estudio se reportan casos que presentan resistencia hasta de 9 drogas (Paciente código 8638/13 – **Anexo VI**).

En este estudio se documentó dos casos de zoonosis por *M. bovis*, los cuales presentaron resistencia solo a pirazinamida, resultado esperado ya que estos casos presentan resistencia intrínseca a este fármaco, característica reportada por Cataldi y Romano (2007).

## **VI.2. Estudio genotípico molecular**

El análisis de MIRU-VNTR de 133 aislados estudiados mostró 125 cepas (94 %) con patrones únicos; es decir, que no están epidemiológicamente relacionados mientras que 8 de las cepas (6 %) estaban integradas en 4 cluster (clustering rate 24 MIRU-

VNTR = 0.03). Este hallazgo es semejante a lo reportado por Martin *et al.* (2007) quienes demuestran que MIRU-VNTR es capaz de discriminar y diferenciar aislados con un supuesto mismo patrón de *Spoligotyping*.

El dendrograma de la **Figura 16** muestra que en la población de estudio existe una baja clonalidad y un alto número de polimorfismos genotípicos en las cepas, estos datos son concordantes con los hallazgos de Baldeviano *et al.* (2007) y Capcha *et al.* (2005) en el Perú, y a diferencia de lo que ocurre en otros países, en los cuales existe una alta clonalidad y un bajo número de genotipos relacionados con esta bacteria, como por ejemplo los estudios de Yang *et al.* (1992) en Dinamarca; Van Soolingen *et al.* (2001) en el este de Holanda; Munsiff *et al.* (2002) en Estados Unidos y Díaz (2003) en Cuba.

En general, en estos estudios mencionados se encuentran grandes agrupaciones de cepas con igual genotipo, siendo raro encontrar clonas aisladas como sucede en gran número en el Perú, además los genotipos de estas agrupaciones tienden a desaparecer a lo largo del tiempo, como lo describió Van Soolingen *et al.* (2001), quedando un menor número de agrupaciones y de genotipos diferentes a lo largo de los años.

En el análisis se identificaron 12 aislados de MTB con un código MIRU-VNTR cero. Este tipo de variantes genéticas no son comunes para aislados de *Mycobacterium sp.*, utilizando estos métodos específicos para el complejo; por lo que es necesario realizar secuenciación completa de dichos aislados para confirmar si se trata de clonas de MTB no reportadas en otros países; así mismo, señalar la necesidad de continuar con estudios moleculares prospectivo que permitan dar seguimiento a la capacidad de diseminación de estas clonas. La naturaleza transversal de este trabajo solo nos

permite plantear la hipótesis de nuevas clonas. Sin embargo, sus características epidemiológicas e implicaciones clínicas futuras no pueden ser determinadas.

Otros resultados interesantes que se encontraron al realizar este estudio son: el alto polimorfismo de genotipos dentro de la población de *M. tuberculosis* MDR en estudio, los cuales en la gran mayoría de casos no son ni siquiera comunes con los reportados anteriormente, donde se encontraron grandes grupos de cepas MDR con un patrón igual y otro grupo más pequeño con un patrón diferente a los casos peruanos encontrados (Aguilar *et al.*, 2010; Iwamoto *et al.*, 2012); otro resultado interesante es la igualdad de genotipos entre cepas sensibles con cepas MDR, siendo estos casos registrados en el Perú por Baldeviano *et al.* (2003) y por Foschiani *et al.* (2002); Miranda *et al.* (2006) en otros países de Sudamérica.

Hasta el 2014 no había información genómica de una cepa MDR en Perú. Por lo tanto, la obtención de esta información es un paso clave en la comprensión de la biología del patógeno y la mejora del tratamiento para TB. Galarza *et al.* (2014) caracterizaron genómicamente una cepa *Mycobacterium tuberculosis* (INS-MDR), a partir de un paciente con TB activa. Se identificó como linaje LAM utilizando la metodología 24 MIRU-VNTR y SNPs. Además se comparó con una cepa africana demostrando que a pesar de las diferencias en el origen geográfico y la alta incidencia de tuberculosis en África del Sur, las cepas tienen similares proporciones de SNPs, que muestran un alto grado de conservación en la estructura del genoma. Sus resultados sugieren que el estallido de la tuberculosis farmacorresistente en Lima y Callao puede ser debido a una expansión clonal de la misma cepa; sin embargo, se requiere más información genómica.

El linaje LAM para la Región Callao se encontró con una prevalencia del 51.1 %, se cree que este linaje se originó en África (Viegas *et al.*, 2010, Thumano *et al.*, 2012,

Homolka *et al.*, 2008), y que llegó a América durante la colonización del continente, por eso su alta frecuencia en Latino América (Cerezo *et al.*, 2011, Taype *et al.*, 2012, Aristimuño *et al.*, 2006). En el presente trabajo, este linaje se identificó mayormente en toda la Región Callao, la residencia o migración de personas provenientes de América Latina hacia la Región Callao mediante el Aeropuerto Internacional Jorge Chávez o Puerto del Callao pudo haber originado la diseminación rápida de este linaje.

El segundo linaje con mayor prevalencia fue el Haarlem, el cual se identificó en la Región Callao en 18.8 %. El linaje Haarlem es típico de Europa (Jagielski *et al.*, 2010, Ghebremichael *et al.*, 2008), pero se ha reportado con mayor frecuencia en América Central (Rosales *et al.*, 2010), se puede inferir que esto se debe al intenso flujo migratorio que existe entre estos países.

Los resultados obtenidos con respecto al linaje Haarlem, fueron similares a lo reportado por Taype y Col. (2012) en Perú, al observarse que la mayoría de los aislados pertenecientes al mismo linaje no presentaban resistencia a fármacos. Este hallazgo es interesante ya que la pertenencia a este linaje podría ser un marcador no excluyente para identificar de manera rápida mayor sensibilidad a fármacos.

El linaje T se halló en el 2.3 % de aislados de la Región Callao, la presencia del linaje T concuerda con lo reportado en investigaciones internacionales, y apoya la idea de que este linaje tiene una distribución global (Molina *et al.*, 2010, Taype *et al.*, 2012), en el presente estudio la mayor incidencia de este linaje se presenta en la Red BEPECA.

El linaje asiático (Beijing), presentó más casos sensibles que casos MDR; sin embargo, se conoce que las cepas asiáticas tienen tendencia a desarrollar multidrogorresistencia más frecuente que los otros linajes en zonas endémicas propias del linaje, como es el caso de China (Aguilar *et al.*, 2010, Rindi *et al.* 2009),

debiéndose posiblemente a la adaptabilidad al ambiente establecido. La presencia de este linaje no es cada vez más prevalente en el Perú; sin embargo, se han reportado en estudios previos (Nava-Aguilera, E. *et al.*, 2011, Zenteno-Cuevas *et al.*, 2012), en donde se puede deducir que este linaje es común en estados portuarios debido a la ruta comercial que existe entre Perú y países asiáticos. Posiblemente, la presencia de este linaje en la Región Callao está relacionada con flujos migratorios de población que radica en la costa y de ahí se fue diseminando hacia el centro del país, contribuyendo a su expansión.

El linaje Uganda se identificó con una frecuencia del 6 %, que concuerda con reportes anteriores (Barletta *et al.* 2013 y Taype *et al.*, 2012) para nuestro país; así como, en investigaciones internacionales para Sudamérica (Dos Santos *et al.*, 2013, Candia *et al.*, 2007 y Abadía *et al.*, 2009).

El linaje S se identificó con una frecuencia muy baja (0.8 %), si bien se desconoce su origen, se cree que es un linaje nuevo, ya que se ha reportado en el mundo con una pequeña frecuencia (Cerezo *et al.*, 2011, Baboolal *et al.*, 2009, Taype *et al.*, 2012) tal como lo reportado en la presente investigación.

El 8.3 % de las cepas no pudieron ser identificadas mediante comparación por agrupamiento en árbol filogenético NJ, a partir de su búsqueda en la base de datos mundial *SpolDB 4.0*, debiéndose posiblemente a la adaptación de la micobacteria a los respectivos nichos ecológicos, los cuales han ayudado de manera importante a su diversificación y particularidad.

Los resultados obtenidos para los linajes prevalentes de *Mycobacterium tuberculosis* en la Región Callao son concordantes con investigaciones realizadas a nivel de América Latina.



Candia *et al.* (2007) en Paraguay utilizaron la metodología *Spoligotyping* y MIRU 12 para identificar el linaje en 220 muestras de las cuales 6 eran MDR, este estudio reportó al linaje LAM como el más prevalente con 52.3 %, seguido del linaje Haarlem con 18.2 %, muestras *Orphans* con 10 %, el linaje Beijing con una prevalencia mínima de 0.5 % y los linajes T y S con 8.6 % y 9.5 % respectivamente.

Abadia *et al.* (2009) en Venezuela utilizaron la metodología *Spoligotyping* y MIRU 24 para identificar el linaje de 1298 muestras, este estudio también reportó al linaje LAM como el más prevalente con 53 %, seguido por el linaje T con 10.6 %, Uganda con 9.7 %, el linaje Haarlem con 5 %, el linaje Beijing con una prevalencia mínima de 0.4 % y el linaje S con 1.9 %. Las muestras *Orphans* reportaron una prevalencia de 17.9 %.

Dos Santos *et al.* (2013) en Fortaleza Brasil utilizaron la metodología *Spoligotyping* para identificar el linaje de 115 muestras de las cuales 48 eran MDR, este estudio también reportó al linaje LAM como el más prevalente con 33 %, seguido por el linaje Haarlem con 12.2 %, Uganda con 5.2 %, el linaje T y S con 2.6 % y 0.9 %, respectivamente Las muestras *Orphans* reportaron una prevalencia de 36 %.

La prevalencia de linajes de *Mycobacterium tuberculosis* según investigaciones en Perú, reportan algunas diferencias con respecto a los resultados de la presente investigación.

Taype *et al.* (2012) en Lima Norte utilizaron la metodología *Spoligotyping* y MIRU 12 para identificar el linaje de 323 muestras de las cuales 26 eran MDR, este estudio reportó al linaje LAM y T como los más prevalentes con 23.8 % ambos , seguido por el linaje Haarlem con 22.3 %, Beijing con 9.3 % y Uganda con 3.6 %. Las muestras *Orphans* reportaron una prevalencia de 13.3 %.

Barletta *et al.* (2013) también en Lima Norte utilizaron la metodología *Spoligotyping* y MIRU 15 para identificar el linaje de 199 muestras de las cuales 15 eran MDR, este estudio reportó al linaje Haarlem como el más prevalente con 29.6 % , seguido por el linaje T con 15.6 % , Beijing con 14.1 % , LAM con 12.6 % y Uganda y S con 8.5% y 1 %, respectivamente. Las muestras *Orphans* reportaron una prevalencia de 15.1 %.

Cáceres *et al.* (2014) con muestras aleatorias de todo el Perú, utilizaron la metodología *Spoligotyping* y MIRU 15 para identificar el linaje de 142 muestras XDR, este estudio reportó al linaje Haarlem como el más prevalente con 43.6 % , seguido por el linaje T con 27.5 % , LAM con 16.2 % , Beijing con 9.2 % . Las muestras *Orphans* reportaron una prevalencia de 1.4 %.

Este panorama posiblemente es consecuencia del alto flujo de visitantes que recibe esta Región (Aeropuerto y Puerto); por lo tanto, es posible el mayor contacto de los pobladores de la Región Callao con personas extranjeras en comparación con poblaciones aledañas..

Esto sugiere que aunque no se puede comprobar la existencia de un linaje relacionado con la resistencia, sí existen algunas clonas de linajes más ampliamente distribuidas y por lo tanto, más fácilmente detectables que otras. No se encontró una clara correlación entre linajes y la jurisdicción de origen de los pacientes de donde se obtuvieron los aislados de *M. tuberculosis* tanto sensibles como MDR.

### **VI.3. Genotipificación piloto en el Penal Sarita Colonia**

En el estudio comparativo de determinación de linajes presentes entre 8 cepas MTB provenientes del Penal Sarita Colonia determinó que linaje LAM es el prevalente en cepas de Penal (87.5 %), donde todas las muestras para este linaje se reportaron

como MDR y el Beijing (12.5 %). Esto es concordante con investigaciones previas (Ivanov *et al.*, 2004) las cuales indican la prevalencia de un solo linaje a través del tiempo dentro de un lugar cerrado al flujo de personas (hospederos) y se demostró la transmisibilidad de cepas MDR pertenecientes a estas dos familias.

#### **VI.4. Sobre la metodología 24 MIRU-VNTR**

##### **Poder discriminatorio de cada uno de los *locus* MIRUs**

La diversidad alélicas de cada *locus* VNTR (**Tabla 6**) se evaluó usando el índice de diversidad Nei y clasificándolo según Sola *et al.* (2003). Así se determinó una nueva serie de *locus* más polimórficos.

La diversidad alélica de los 14 MIRU-VNTR con alto polimorfismo en las 133 cepas de *M. tuberculosis* de la Región Callao son: QUB 26 (0.82), QUB 11b y MIRU 40 (0.76) ambos, MIRU 26 (0.72), ETRC (0.71), MTUB 30 (0.70), MIRU 10 (0.68), MIRU 23 y MTUB 21 (0.67) ambos, MTUB04 (0.66), MTUB39 (0.65), MIRU 31 (0.64), MTUB34 (0.63) y MIRU 16 (0.61). Los cuales contribuyeron mejor a la diferenciación de las cepas estudiadas en la Región Callao y podrán ser utilizados para estudios epidemiológicos futuros.

#### **VI.5. Importancia del Estudio**

La Región Callao muestra una gran diversidad de linajes; así como, la presencia de patrones huérfanos endémicos. La información reportada en esta investigación permite reconocer los linajes que se encuentran circulando en toda la región; así mismo, su posible relación con multidrogorresistencia, lo cual será de gran utilidad al sector salud, para establecer programas de control y prevención oportuna de casos de tuberculosis.

## VII. CONCLUSIONES

- La metodología de genotipificación MIRU-VNTR usada en el presente estudio posee una alta resolución para la observación de un gran número de polimorfismos dentro de una población bacteriana de *M. tuberculosis*, por lo que es adecuada para realizar estudios epidemiológicos.
- La genotipificación utilizando la metodología MIRU-VNTR para 133 muestras analizadas de la Región Callao reportó un alto poder discriminatorio de este método con un HGDI de 0.995, además que el linaje LAM fue el más prevalente (51.1 %), seguido por Haarlem (18.8 %), el linaje asiático Beijing (8.3 %), el linaje Uganda se identificó en el 6 % y los linajes T y S se observaron con un 2.3 % y 0.8 %, respectivamente. Se identificaron como *Orphans* (huérfanos) un 8.3 % de las cepas analizadas.
- Ningún linaje de *M. tuberculosis* estuvo relacionado con la jurisdicción de origen de los pacientes ni con el patrón de susceptibilidad.
- Existen cepas sensibles a las drogas antituberculosas que poseen igual genotipo que las cepas resistentes.
- Existe una baja clonalidad y un alto número de polimorfismos genotípicos de las cepas, por lo cual no se puede asociar un perfil genotípico particular con determinadas drogorresistencias.
- La población masculina presenta mayor riesgo de contagio por TB, encontrándose dentro del rango de edad reproductiva, siendo la población de mayor riesgo los menores de 30 años.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda continuar los estudios epidemiológicos moleculares sobre TB como una herramienta de vigilancia dentro de nuestra población.
- La población escogida dentro de los estudios epidemiológicos generales en TB deberían tomarse dentro de una muestra que abarquen hospitales de todos los sistemas de salud (MINSA, ESSALUD y Fuerzas Armadas), lo cual es ideal en este tipo de investigaciones.
- El análisis y la discusión de los métodos moleculares de genotipificación siempre deben de complementarse con los datos epidemiológicos de cada uno de los pacientes.
- Dentro de los patrones de riesgo relacionados con los dendrogramas producidos en base a patrones genéticos, es recomendable solo usar agrupaciones con similitudes mayores o iguales al 80 %, como medida estándar.
- Se recomienda estandarizar el proceso de PCR con el DNA de la cepa de referencia H37Rv, la cual es pansensible a antibióticos antituberculosos y cuyo patrón de genotipificación constante es reportado por las bases de datos mundiales.
- Al realizar comparaciones con bases de datos internacionales se deben tener en cuenta las diferentes variables e información de los pacientes con el fin de establecer relaciones entre dichas variables con los linajes particulares.

- Implementar la automatización de este método de genotipificación para hacer más eficiente y económico el proceso
- La presencia de cepas multidrogorresistentes: MDR y XDR con amplia permanencia y circulación en la Región, además de la presencia de cepas sensibles con igual genotipo que las drogorresistentes, conduce a que el sistema de salud del país debe mejorar sus políticas de salud frente a esta enfermedad que afecta a más de 30,000 personas con casos nuevos de TB.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADÍA, E., *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* ecology in Venezuela: epidemiologic correlates of common spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR-24. *BMC Infect. Dis.* 2009;9:122.
- AGUILAR, L., HANEKOM, M., MATA, D., PITTIUS, NC., HELDEN, PD., WARREN, RM., HERNANDEZ-PANDO, R. *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. *Tuberculosis.* 2010;90:319-325.
- ALLIX-BERGUEC, C., FAUVILLE-DUFAUX, M., SUPPLY, P. Three-Year Population-Based Evaluation of Standardized Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit–Variable-NumberTandem-Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1398-1406.
- ALLIX-BERGUEC, C., SUPPLY, P., FAUVILLE, M. Utility of fast Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clinical Infectious Diseases.* 2004;39:783-789.
- ARISTIMUÑO, L., ARMENGOL, R., CEBOLLADA, A., ESPAÑA, M., GUILARTE, A., LAFOZ, C., LEZCANO, MA., REVILLO, MJ., MARTÍN, C., RAMÍREZ, C., RASTOGI, N., ROJAS, J., DE SALAS, AV., SOLA, C., SAMPER, S. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the First National Survey of Anti-tuberculosis Drug Resistance from Venezuela. *BMC Microbiology.* 2006;6:90.
- ASENCIOS, Luis; GALARZA, Marco; QUISPE, Neyda; VÁSQUEZ, Lucy; LEO, Elena; VALENCIA, Eddy; RAMÍREZ, Juan; ACURIO, Margoth; SALAZAR, Rosario;

MENDOZA -TICONA, Alberto; CÁCERES, Omar. Prueba molecular genotype® mtbdrplus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogorresistente. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2012;29(1):92-98.

- BABOOLAL, S., MILLET, J., EBERECHI, A., RAMOUTAR, D., RASTOGI, N. First Insight into *Mycobacterium tuberculosis* Epidemiology and Genetic Diversity in Trinidad and Tobago. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47:1911-1914.
- BALDEVIANO, C., LUNA, C., CÁCERES, T., CALDERÓN, R. Detección sensible y específica de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras clínicas mediante la amplificación de un elemento repetitivo de la familia REP13E12. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2007;24(1):5-12.
- BALDEVIANO, C., QUISPE, N. BONILLA, C., GASTIABURU, D., PRO, J., LLANOS-ZAVALAGA, LF. Perfiles genéticos (RFLP-IS6110) y resistencia a drogas en aislamiento de *M. tuberculosis* de pacientes internados en un hospital de referencia del Callao, Perú. *Peru. Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2003;20:72-77.
- BARLETTA, Francesca, OTERO, Larissa, COLLANTES, Jimena, ASTO, Belisa, BOUKE, C de Jong, SEAS, Carlos, RIGOUTS, Leen. Genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* complex in patients with no known risk factors for MDR-TB in the North-eastern part of Lima, Perú. *BMC Infectious Diseases*. 2013;13:397.
- BARNES, C., HILL, RS., HINSHAW, G., PAGE, L., BENNETT, CL., HALPERN, M., JAROSIK, N., KOGUTA, LIMON, M., MEYER, SS. , TUCKER, GS., WOLLACK, E., WRIGHT, EL. First Year Wilkinson Microwave Anisotropy Probe (WMAP)



Observations: Galactic Signal Contamination from Sidelobe Pickup. *The Astrophysical Journal Supplement Series*. 2003;148:51-62.

- BARÓN, Betty, SOTO, Víctor, ROSARIO, Moisés. Validez del método concentrado en esputo con hipoclorito de sodio para el diagnóstico de tuberculosis en pacientes con radiografía anormal y baciloscopía negativa. *Rev Cuerpo Médico HNAAA*. 2012;5(2):15-18.
- BROSCH, R., GORDON, M., MARMIESSE, P., BRODIN, C., BUCHRIESER, K., EIGLMEIER, T., GARNIER, C., GUTIERREZ, G., HEWINSON, K., KREMER, L., PARSONS, M., PYM, AS., SAMPER, S., VAN SOOLINGEN, D., COLE, ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002;99:3684–3689.
- BRUDEY, K., DRISCOLL, JR., RIGOUTS, L., PRODINGER, WM., GORI, A., AL-HAJJOJ, SA. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol*. 2006;6:23.
- CÁCERES, Omar, RASTOGI, Nalin, BARTRA, Carlos, COUVIN, David, GALARZA, Marco, ASCENCIOS, Luis, MENDOZA-TICONA, Alberto. Characterization of the Genetic Diversity of Extensively-Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Clinical Isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients in Perú. *Plos One*. 2014;9(12).
- CANDIA, N., LOPEZ, B., ZOZIO, T., CARRIVALE, M., DIAZ, C., RUSSOMANDO, G., DE ROMERO, NJ., JARA, JC., BARRERA, L., RASTOGI, N., RITACCO, V. First

insight into *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. *BMC Microbiol.* 2007;7:75.

- CAPCHA, L., URBINA, M., VASQUEZ, L., ASCENCIOS, L., QUISPE, N., LEO, E., BALDEVIANO, C., ZAVALA, A. Perfiles Genéticos (IS6110) y patrones de Resistencia en aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes con Tuberculosis Pulmonar, Lima Sur, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2005;22:4-11.
- CATALDI, A., ROMANO, MI. TB caused by other members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. In *JC Palomino.* 2007;450 pp.
- CAVIEDES, L., LEE, TS., GILMAN, RH., SHEEN, P., SPELLMAN, E., LEE, EH., *et al.* Rapid efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Perú. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1203-8.
- CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second line-drugs worldwide 2000-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2006;55:302-305.
- CEREZO, I., JIMÉNEZ, Y., HERNANDEZ, J., ZOZIO, T., MURCIA, M., RASTOGI, N. A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. *Infect. Gen. and Evol.* 2011.
- COLE, S. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology.* 2002;148(10):2919-2928.

- CRONIN, WA., GOLUB, JE., LATHAN, MJ. *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in a low-to moderate-incidence state: are contact investigations enough? *Emerg Infect Dis.* 2002;8:1271-9.
- DANIEL, TM, BATES, JH, DOWNER'S, KA. History of tuberculosis. Bloom BR, editors, Tuberculosis: pathogenesis, Protection and Control. Washington D.C. *American Society for Microbiology.* 1994;13-19.
- DEMAY, C. *et al.* SITVITWEB—a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* 2012;12:755–766.
- DIAZ, R. Caracterización molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y su implicación en el control de la tuberculosis en Cuba. (Tesis presentada con opción al grado científico de Doctor en Ciencias de Salud). La Habana: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” Subdirección de Microbiología Departamento de bacteriología – micología. 2003.
- DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD DEL CALLAO (DIRESA CALLAO). Oficina de Epidemiología. Semana Epidemiológica (SE) N°52. 22/12/2013 al 28/12/2013.
- DORRONSORO, I. y TORROBA, L. Microbiología de la tuberculosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra.* 2007;30(2):67-84.
- DOS SANTOS, R., SUFFYS, P., BARROSO, E., SANSIGOLO, L., ROMARIZ, C., CARIOCA, MV., SALANI, RM., CUNHA, C. Genotyping and drug resistance

patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains observed in a tuberculosis high-burden municipality in Northeast, Brazil. *Braz j infect dis*. 2013;17(3):338–345.

- DYE, C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet*. 2006;367:938–940.
- FILLIOL, I., MOTIWALA, AS., CAVATORE, M., QI, W., HAZBÓN, MH., BOBADILLA DEL VALLE, M., FYFE, J., GARCÍA-GARCÍA, L., RASTOGI, N., SOLA, C., ZOZIO, T., GUERRERO, MI., LEÓN, CI., CRABTREE, J., ANGIUOLI, S., EISENACH, KD., DURMAZ, R., JOLOBA, ML., RENDÓN, A., SIFUENTES-OSORNIO, J., PONCE DE LEÓN, A., CAVE, MD., FLEISCHMANN, R., WHITTAM, TS., ALLAND, D. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J. Bacteriol*. 2006;188:759-772.
- FLEISCHMANN, RD., ALLAND, D., EISEN, JA., CARPENTER, L., WHITE, O., PETERSON, J., *et al*. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol*. 2002;184:5479-90.
- FOSCHIANI, I., CARDOSO, M., ARAUJO, D., SUFFYS, P. Drug resistance and genotypes of strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from human immunodeficiency virusinfected and non-infected tuberculosis patients in Bauru, Sao Paulo, Brazil. *Mem Ins Oswaldu Cruz*. 2002;97:1147-1152.
- FROTHINGHAM, R. y O'CONNELL, M. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*. 1998;144:1189-1196.

- FUJIKI, A. The research institute of tuberculosis in Japan (RIT/JATA). TB Bacteriology examination to Stop TB, Center for disease control and prevention (CDC), UNICEF WHO/TB/98.258. For the global tuberculosis program. Laboratory services in tuberculosis control Part II Microscopy.
- GAGNEUX, S., LONG, CD., SMALL, PM., VAN, T., SCHOOLNIK, GK., BOHANNAN, BJM. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2006;312:1944–1946.
- GALARZA, M., TARAZONA, D., BORDA, V., AGAPITO, JC., GUIO, H. Evidence of clonal expansion in the genome of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate from Perú. *Genome Announc*. 2014;2(1).
- GARCÍA, M. Epidemiología Molecular en México. *Gaceta Médica Mexicana*. 2003;139(9):472-476.
- GHEBREMICHAEL, S., PETERSSON, R., KOIVULA, T., PENNHAG, A., ROMANUS, V., BERGGREN, I., *et al*. Molecular epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Sweden. *Microbes and Infection*. 2008;10:699-705.
- GUTACKER, MM., MATHEMA, H., SOINI, E., SHASHKINA, B., KREISWIRTH, N., GRAVISS, EA., MUSSER, JM. Single-nucleotide polymorphism based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *J. Infect. Dis*. 2006;193:121–128.

- HAIN LIFESCIENCE [Internet]. Nehren, Germany: Hain Lifescience GmbH; 2010 [actualizada el 22 de agosto del 2009; citada el 12 julio del 2010]. GenoType® MTBDRplus; [aprox. 2 pantallas]. Disponible en: <http://www.hainlifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/genotype-mtbdplus.html>
- HAWKEY, P., SMITH, E., EVANS, J., MONK, P., BRYAN, G., MOHAMED, H., BARDHAN, M., PUGH, N. Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Compared to IS6110-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Investigation of Apparently Clustered Cases of Tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3514-3520.
- HOMOLKA, S., POST E., OBERHAUSER, B., GARAWANI, A., WESTMAN, L., DAFAE, F., *et al.* High genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from Sierra Leone. *BMC Microbiology.* 2008;8:103.
- HONG, X. y HOPFINGER, AJ. Construction, molecular modeling, and simulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell walls. *Biomacromolecules.* 2004;5:1052–1065.
- HUEBNER, RE., SCHEIN, MF., BASS, JB. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis.* 1993;17:968-75.
- HUNTER, PR. y GANSTON, MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988;26:2465-2466.

- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA E INFORMATICA DEL PERU (INEI), 2007. Censos Nacionales 2007: XI de Población y VI de Vivienda. (Online.) <http://www.inei.gob.pe/inicio.htm>
- IVANOV, IIU., STEPANSHINA, VN., LIPIN, MIU., KOROBOVA, OV., SHEMIAKIN, IG. Spoligotypes of clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in patients with tuberculosis in the Central Region of Russia. *Probl Tuberk Bolezn Legk.* 2004;4:23–27.
- IWAMOTO, T., GRANDJEAN, L., ARIKAWA, K., NAKANISHI, N., CAVIEDES, L., CORONEL, J., *et al.* Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Perú. *PLoS One.* 2012;7(11).
- JACOBS, RF. Multiple-drug resistance tuberculosis. *Clinical Infectious Disease.* 1994;19:1-10.
- JAGIELSKI, T., AUGUSTYNOWICZ-KOPEC, E., ZOZIO, T., RASTOGI, N., ZWOLSKA, Z., *et al.* Spoligotype-Based Comparative Population Structure Analysis of Multidrug-Resistant and Isoniazid-Monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Clinical Isolates in Poland. *Journal of Clinical Microbiology.* 2010;48:3899-3909.
- JUEZ, P. Herramientas estadísticas para la investigación en Medicina y Economía de la Salud. Madrid. Ed. Centro de Estudios Ramón Areces. 2001.

- KAMERBEEK, J., SCHOULS, L., KOLK, A. *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35:907-914.
- KANDUMA, E. *et al.* Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J. Appl. Microbiol.* 2003;94:781–791.
- KASPER, D., BRAUNWALD, E., FAUC, A., HAUSER, S., LONGO, D., JAMESON, J., *et al.* Harrison principals of medicine internal. *Ed McGraw.* 2005.
- KREMER, K., VAN SOOLINGEN, D., FROTHINGHAM, R., HAAS, WH., HERMANS, PW., MARTIN, C., *et al.* Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol.* 1999;37(8):2607-18.
- KWARA, A., SCHIRO, R., COWAN, L., HYSLOP, N., WISER, M., HARRISON, S., KISSINGER, P., DIEM, L., CRAWFORD, J. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2683-2685.
- LALVANI, A., PATHAN, AA., DURKAN, H., WILKINSON, KA., WHELAN, A., DEEKS, JJ., REECE, WH., LATIF, M., PASVOL, G., HILL, AV. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet.* 2001;357:2017-2021.



- LEÓN, CI., GUERRERO, MI., NARANJO, N., GARZÓN, MC., SIERRA, C. Descripción de la población tuberculosa colombiana (1999-2000). *Infectio*. 2002;6:84.
- LIMA, SS., CLEMENTE, WT., PALACI, M., ROSA, RV., ANTUNES, CM., SERUFO, JC. Conventional and molecular techniques in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a comparative study. *J Bras Pneumol*. 2008;34(12):1056-1062.
- MARTIN, A., HERRANZ, M., RUIZ, M., BOUZA, E., GARCIA, D. Rapid clonal analysis of recurrent tuberculosis by direct MIRU-VNTR typing on stored isolates. *BMC Microbiol* .2007;7:7.
- MATHERS, CD., FAT, DM., INOUE, M., RAO, C., LOPEZ, AD. Counting the dead and what they died from: an assessment of the global status of cause of death data. *Bull World Health Organ*. 2005;83:171-7.
- MAZARS, E., LESJEAN, S., BANULS, A. L., GILBERT, M., VINCENT, V., GICQUEL, B., TIBAYRENC, M., LOCHT, C. , SUPPLY, P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:1901–1906.
- MIDDLEBROOK, G., REGGIARDO, Z., TIGERTT, W.D. Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. *American Review of Respiratory Disease*. 1977;115,1067-1069.

- MINISTERIO DE SALUD (MINSA): Estrategia Sanitaria Nacional para la Prevención y Control de la Tuberculosis. Norma Técnica de Salud para el Control de la Tuberculosis; 2013.
- MINISTERIO DE SALUD (MINSA): Estrategia Sanitaria Nacional para la Prevención y Control de la Tuberculosis. Norma Técnica de Salud para el Control de la Tuberculosis; 2011.
- MINISTERIO DE SALUD (MINSA): Estrategia Sanitaria Nacional para la Prevención y Control de la Tuberculosis. Norma Técnica de Salud para el Control de la Tuberculosis; 2006.
- MIRANDA, J., RIOS, R., CLAVIJO, A., CHACON, C., MATTAR, S. Estudio preliminary de la susceptibilidad antimicrobiana y variabilidad genética de *Mycobacterium tuberculosis* en un área del Caribe colombiano. *Coloma, Med.* 2006;37:275-286.
- MOLINA, C., MORENO, E., OCAMPO, J., RENDON, A., BLACKWOOD, K., KREMER, K., RASTOGI, N., WELSH, O., VERA, L. *Mycobacterium Tuberculosis* Spoligotypes in Monterrey, México. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48:448-455.
- MOORE, D., EKWARU, P., LIECHTY, C., WERE, W., MWIMA, G., SOLBERG, P. Prevalence, incidence and outcomes of tuberculosis treatment in HIV+ individuals initiating home-based antiretroviral therapy in rural Uganda. En: *13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. Denver, Colorado, USA. 2006

- MOSTROM, P., GORDON, M., SOLA, C., RIDELL, M., RASTOGI, N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol and Infection*. 2002; 8:694-704.
- MUNSIFF, SS., BASSOFF, T., NIVIN B., LI, J., SHARMA, A., BIFANI. P., MATHEMA, P., DRISCOLL, J., KREISWIRTH, N. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant Tuberculosis, New York City, 1995-1997. *Emerg. Infect. Dis.* 2002;8:1230-1238.
- MURRAY, PR., ROSENTHAL, KS., KOBAYASHI, GS., PFALLER, MA. Medical Microbiology. En: *4th ed. Mosby, Inc.*, St. Louise, Missouri USA. 2002;366–368.
- NAVA-AGUILERA, E., LÓPEZ-VIDAL, Y., HARRIS, E., MORALES-PÉREZ, A, MITCHELL, S., FLORES-MORENO, M., *et al.* Clustering of *Mycobacterium tuberculosis* cases in Acapulco: spoligotyping and risk factors. Hindawi publishing corporation, *Clinical and developmental immunology*. 2011.
- NICOL, Mark y WILKINSON, Robert. The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008. 102:955-965.
- NIEMANN, S., RICHTER, E., RU" SCH-GERDES, S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide susceptible subtypes of *M. bovis*. *J Clin Microbiol*. 2000;38:152–157.

- NIYAZ, Ahmed, CAVIEDES, Luz, MAHFOOZ, Alam, RAJENDER, K, SANGAL, Vartul, SHEEN, Patricia, GILMAN, Robert; SEYED, Hasnain. Distinctiveness of *Mycobacterium tuberculosis* Genotypes from Human Immunodeficiency Virus Type 1-Seropositive and –Seronegative Patients in Lima, Perú. *Journal of clinical microbiology*. 2003;1712–1716.
- PETER, F., BARNES, MD., DONALD, C. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med*. 2003;349:1149-56.
- PLAN REGIONAL DE TUBERCULOSIS 2006 – 2015. Organización Panamericana de la Salud PAHO, Plan regional de Tuberculosis 2006-2015 Washington, D.C: OPS 2006. ISBN 92 75 32673 8.
- RINDI,L., LARI,N., CUCCU, B., GARZELLI, C. Evolutionary pathway of the Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* based on genomic deletions and *mutT* genes polymorphisms. *Infections, Genetics and Evolution*. 2009;9:48-53.
- ROSALES, S., PIEDA-GARCÍA, L., GHEBREMICHAEL, S., RASTOGI, N., HOFFNER,S. Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with tuberculosis in Honduras. *BMC Microbiology*. 2010;10:208.
- SANGER INSTITUTE. «*Mycobacterium tuberculosis*». 2007-03-29. Retrieved 2008-11-16.
- SAVINE, E., WARREN, R., VAN DER SPUIY, G., BEYERS, N., VAN HELDEN, P., LOCHT, C., SUPPLY, P. Stability of Variable-Number Tandem Repeats of

Mycobacterial Interspersed Repetitive Units from 12 *Loci* in Serial Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2002;40:4561–4566.

- SHARMA, J., ROY, K., PUSHPARAJ, M., KUMAR, S., MALHOTRA, N., MITTAL, S. Laparoscopic findings in female genital tuberculosis. *Arch Gynecol Obstet*. 2008;278:359-364.
- SHEEN, Patricia, COUVIN, David, GRANDJEAN, Louis, ZIMIC, Mirko, DOMINGUEZ, Maria, LUNA, Giannina, GILMAN, Robert, RASTOGI, Nalin, MOORE, David. Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Perú and Exploration of Phylogenetic Associations with Drug Resistance. *Plos One*. 2013; 8(6).
- SMALL, PM., SHAFER, RW., HOPEWELL, PC. *et al*. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *New England Journal of Medicine*. 1993;328:1137–1144.
- SOLA, C., FILLIOL, I., LEGRAND, E., LESJEAN, S., LOCHT, C., SUPPLY, P., RASTOGI, N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and Spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection Genetics and Evolution*. 2003;3:125-133.
- SOLA, C., FILLIOL, I., GUTIERREZ, M., MOKROUSOV, I., VINCENT, V., RASTOGI, N. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(3):391- 396.

- STREICHER, EM., VICTOR, TC., VAN DER SPUY, G., SOLA, C., RASTOGI, N., VAN HELDEN, PD., WARREN, RM. Spoligotype signatures in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45:237–240.
- SUPPLY, P. *et al.* Proposal for standardization of optimized Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4498-4510.
- SUPPLY, P., LESJEAN, S., SAVINE, E., KREMER, K., VAN SOOLINGEN, D., LOCHT, C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3563–3571.
- SUPPLY, P., MAZARS, E., LESJEAN, S., VINCENT, V., GICQUEL, B., LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000;36:762-771.
- SUPPLY, P., LESJEAN, E., SAVINE, K., KREMER, K., VAN SOOLINGEN, D., LOCHT, C. Identification of novel intergenic repetitive units in a Mycobacterial two component system operon. *Mol. Microbiol.* 1997;26:991-1003.
- TAYPE, CA., AGAPITO, JC., ACCINELLI, RA., ESPINOZA, JR., GODREUIL, S., GOODMAN, SJ. *et al.* Genetic diversity, population structure and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Perú. *Infect Genet Evol.* 2012;12(3):577-85.

- TELENTI, A., MARCHESI, F., BALZ, M., BALLY, F., BÖTTGER, EC., BODMER, T.  
Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:175-8.
- TICONA, E.. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Diagnóstico.* 2013;52(1).
- THUMAMO, B., ASUQUO, A., ABIA-BASSEY, L., LAWSON, L., HILL, V., ZOZIO, T.  
*et al.* Molecular epidemiology and genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex in the Cross River State, Nigeria. *Infect. Gen. and Evol.* 2012.
- TORTOLI, E., BENEDETTI, M., FONTANELLI, A., SIMONETTI, M. Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460 TB method and the agar plate method of proportion. *J Clin Microbiol.* 2002;40:607-10.
- VALCHEVA, V., MOKROUSOV, I., RASTOGI, N., NARVSKAYA, O., MARKOVA, N.  
Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from different regions of Bulgaria. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1014-1018.
- VAN DEUTEKOM, H., SUPPLY, P., DE HAAS, P., WILLERY, E., HOIJNG, S., LOCHT, C., COUTINHO, R., VAN SOOLINGEN, D. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number-tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4473-4479.

- VAN EMBDEN, JD., CRAWFORD, JT. *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993;31:406-9.
- VAN SOOLINGEN, D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Intern. Med.* 2001;249,1-26.
- VIEGAS, S., MACHADO, A., GROENHEIT, R., GHEBREMICHAEL, S., PENNHAG, A., GUIDO, P., *et al.* Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mozambique. *BMC Microbiology.* 2010;10:195.
- WARREN, R., VICTOR, T., STREICHER, E., RICHARDSON, M., BEYERS, N., VAN PITTIUS, N., VAN HELDEN, P. Patients with Active Tuberculosis often Have Different Strains in the Same Sputum Specimen. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:610–614.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: Global tuberculosis report. *WHO Report 2014.* Geneva, Switzerland.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. *WHO Report 2013.* Geneva, Switzerland.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION: Global tuberculosis report. *WHO Report 2012.* Geneva, Switzerland.



- WORLD HEALTH ORGANIZATION: Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) 2010 Global Report on Surveillance and Response.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2008. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Fourth Global Report. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance 2002-2007. Geneva, Switzerland: World Health Organization Perú, Ministerio de Salud, 2006. Construyendo alianzas estratégicas para detener la tuberculosis: La experiencia peruana. Lima: MINSA/DGSP.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. *WHO Report 2008*. Geneva, Switzerland.
- YANG, ZH., DE HAAS, PE., WACHMANN, CH., *et al*. Molecular epidemiology of tuberculosis in Denmark in 1992. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2077–81.
- ZENTENO-CUEVAS, R., CUEVAS-CORDOBA, B., ENCISO, A., ENCISO, L., CUELLA, A. Assessing the utility of three TaqMan probes for the diagnosis of tuberculosis and resistance to rifampin and isoniazid in Veracruz, Mexico. *Can. J. Microbiol*. 2012. 58:318-322.

## **X. ANEXOS**

**ANEXO I: Secuencias de iniciadores (primers) de cada uno de los locus MIRUs.**

LOCUS	ALIAS	TAMAÑO	Secuencia (5' -> 3')	Secuencia (3' -> 5')
154	MIRU02	53	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT	TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT
424	Mtub04	51	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT	GGCAGCAGAGCCCCGGGATTCTTC
577	ETRC	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTATCT	AATGACTTGAACGCGCAAAATTGTGA
580	MIRU04	77	GCGCGAGAGCCCCGAACTGC	GCGCAGCAGAAACGCCAGC
802	MIRU40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT	GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
960	MIRU10	53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC	GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
1644	MIRU16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAAGTA	CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
1955	Mtub21	57	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC	CAACATCGCCTGGTTCTGTA
2059	MIRU20	77	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG	GGAGACCGCAGCAGGTACTTGTA
2163b	QUB11b	69	CGTAAGGGGGATCGGGGAAATAGG	CGAAGTGAATGGTGGCAT
2165	ETRA	75	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT	CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT
2347	Mtub29	57	GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT	AGCCACCCGGTGTGCCTTGATGAC
2401	Mtub30	58	CTTGAAGCCCCCGGTCTCATCTGT	ACTTGAACCCCCCAGCCCATTAGTA
2461	ETRB	57	ATGGCCACCCGATACCCGCTTCAGT	CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
2531	MIRU23	53	CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG	AGCTCAACGGGTTGCCCTTTTGTG
2687	MIRU24	54	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT	GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
2996	MIRU26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC	CATAGGCGACCGGCGGAATAG
3007	MIRU27	53	TCGAAAGCCCTCTGCGTGCCAGTAA	GCGATGTAGCGTGCCACTCAA
3171	Mtub34	54	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA	GGCTCTCATTGCTGGAGGTTGTAC
3192	MIRU31	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	GTGCCGACGTGGTCTTGAT
3690	Mtub39	58	CGGTGGAGGCGGATGAACGTCTTC	TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
4052	QUB26	111	AACGCTCAGCTGTCGGAT	CGGCCGTGCCGGCCAGGTCTTCCCGAT
4156	QUB4156	59	TGACCACGGATTGCTCTAGT	GCCGGCGTCCATGTT
4348	MIRU39	53	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC	CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT

**ANEXO II:** Estandarización de componentes de PCR (µL) para cada MIRU.

	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4
	MgCl 1.5 mM	MgCl 2mM	MgCl 3mM	MgCl 1.5 Mm
Agua (µL)	12.5	12.3	11.9	10.1
Buffer 10x (µL)	2	2	2	2
MgCl2 50 mM (µL)	0.6	0.8	1.2	0.6
Primer Forward 20 pmol/µL (µL)	0.4	0.4	0.4	0.4
Primer Reverse 20 pmol/µL (µL)	0.4	0.4	0.4	0.4
DNTP 10 mM (µL)	1.2	1.2	1.2	0.4
Betaína 5M (µL)	0.8	0.8	0.8	4
DNA Polymerase (5 U/µl) (µL)	0.1	0.1	0.1	0.1
DNA 10ng/ µL (µL)	2	2	2	2

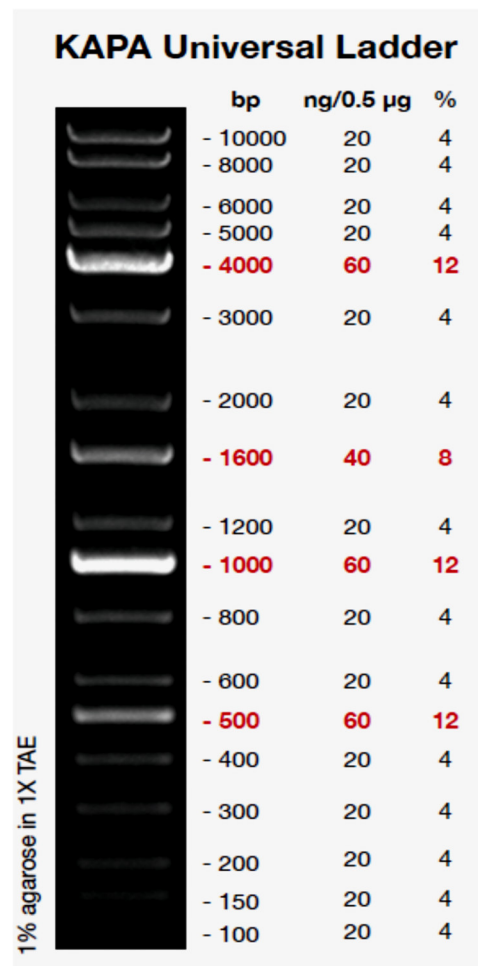
**1:** MTUB 04, MIRU 20, ETRA, MIRU 23, MIRU 24, MIRU 27, QUB 26, MIRU 39

**2:** MIRU 16, MTUB 29, ETR B, MIRU 26, MTUB 34, MIRU 31, MTUB 39

**3:** MIRU 02, ETRC, MIRU 04, MIRU 40, MIRU 10, MTUB21, QUB 11, MTUB 30

**4:** QUB 4156

**ANEXO III:** Marcador de peso molecular de 100 pares de bases.



## ANEXO IV:

**Tabla 9:** Número de repeticiones alélicas usando 24 estándares MIRU-VNTR (Supply et al., 2006).

Locus Convention	MIRU 02	MIRU 04	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40	VNTR 42	VNTR 43	VNTR 1955	VNTR 2163b	ETRA	VNTR 46	VNTR 47	VNTR 48	VNTR 49	VNTR 3690	QUB-26	VNTR 53
Allele	154	580	960	1644	2059	2551	2687	2996	3007	3192	4348	802	424	577	1955	2163	2165	2347	2401	2461	3171	3690	4052	4156
0	402	175	482	565	437	150	395	285	498	492	540	354	537	171	92	77	195	335	247	347	326	272	187	563
1	455	252	537	618	514	200	447	336	551	545	593	408	588	208	149	146	270	392	305	404	380	330	298	622
2	508	329	590	671	591	253	501	387	604	598	646	462	639	266	206	215	345	449	363	461	434	388	409	681
3	561	406	643	724	668	306	555	438	657	651	699	516	690	324	263	284	420	506	421	518	488	446	520	740
4	614	483	696	777	745	359	609	489	710	704	752	570	741	382	320	353	495	563	479	575	542	504	631	799
5	667	560	749	830	822	412	663	540	763	757	805	624	792	440	377	422	570	620	537	632	596	562	742	838
6	720	637	802	883	899	465	717	591	816	810	858	678	843	498	434	491	645	677	595	689	650	620	853	917
7	773	714	855	936	976	518	771	642	869	863	911	732	894	556	491	560	720	734	653	746	704	678	964	976
8	826	791	908	989	1053	571	825	693	922	916	964	786	945	614	548	629	795	791	711	803	758	736	1075	1035
9	879	868	961	1042	1130	624	879	744	975	969	1017	840	996	672	605	698	870	848	769	860	812	794	1186	1094
10	932	945	1014	1095	1207	677	933	795	1028	1022	1070	894	1047	730	662	767	945	905	827	917	866	852	1297	1153
11	985	1022	1067	1148	1284	730	987	846	1081	1075	1123	948	1098	788	719	836	1020	962	885	974	920	910	1408	1212
12	1038	1099	1120	1201	1361	783	1041	897	1134	1128	1176	1002	1149	846	776	905	1095	1019	943	1031	974	968	1519	1271
13	1091	1176	1173	1254	1438	836	1095	948	1187	1181	1229	1056	1200	904	833	974	1170	1076	1001	1088	1028	1026	1630	1330
14	1144	1253	1226	1307	1515	889	1149	999	1240	1234	1282	1110	1251	962	890	1043	1245	1133	1059	1145	1082	1084	1741	1389
15	1197	1330	1279	1360	1592	942	1203	1050	1293	1287	1335	1164	1302	1020	947	1112	1320	1190	1117	1202	1136	1142	1852	1448

# **ANEXO V: Cuantificación de DNA de las 133 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* estudiadas.**

CÓDIGO	DNA (ng/μL)	4521/13	17.8	5781/13	38.0	8351/13	24.3	9398/13	38.6
1605/13	64.0	4540/13	18.0	5794/13	29.5	8478/13	31.3	9404/13	100.8
2212/13	29.31	4543/13	16.6	5853/13	18.0	8547/13	41.9	9405/13	41.6
2296/13	48.1	4544/13	13.2	5863/13	30.7	8604/13	21.6	9417/13	10.2
2832/13	69.5	4548/13	23.0	5993/13	45.8	8638/13	15.7	9418/13	33.9
2833/13	47.1	4554/13	38.8	5996/13	17.0	8714/13	14.3	9428/13	63.7
2906/13	29.0	4666/13	49.2	6021/13	35.1	8715/13	17.9	9432/13	23.4
2996/13	75.0	4725/13	34.8	6036/13	37.0	8720/13	18.0	9434/13	45.7
3033/13	90.8	4910/13	31.0	6054/13	52.7	8821/13	20.0	9437/13	68.4
3184/13	69.7	5052/13	28.7	6227/13	15.0	8838/13	47.4	9461/13	32.3
3283/13	38.3	5057/13	20.0	6231/13	23.8	8853/13	20.4	9464/13	58.6
3349/13	40.0	5086/13	15.0	6300/13	15.0	8895/13	34.6	9485/13	80.5
3359/13	38.0	5099/13	32.0	6349/13	10.7	8997/13	26.6	9499/13	26.2
3407/13	17.2	5100/13	17.8	6358/13	10.1	9084/13	14.7	9506/13	80.7
3461/13	11.6	5186/13	42.0	6372/13	10.4	9086/13	22.1	9514/13	57.8
3563/13	16.3	5360/13	16.0	6445/13	10.3	9172/13	53.4	9519/13	34.4
3585/13	53.7	5503/13	11.5	6835/13	11.4	9182/13	20.7	9520/13	44.4
3679/13	56.0	5530/13	11.0	7167/13	23.5	9267/13	18.8	9650/13	47.4
3866/13	17.0	5564/13	46.5	7214/13	34.6	9278/13	19.1	9664/13	32.4
3873/13	44.0	5569/13	199.0	7291/13	14.3	9283/13	31.5	9851/13	37.1
3935/13	39.5	5575/13	98.7	7317/13	16.7	9302/13	19.0	9852/13	27.0
3938/13	25.3	5585/13	20.2	7533/13	19.6	9307/13	18.6	10158/13	34.6
4266/13	38.0	5589/13	25.4	7740/13	20.5	9311/13	55.4	10164/13	56.6
4450/13	14.28	5677/13	18.1	7766/13	24.7	9345/13	57.2	10322/13	67.3
4469/13	38.0	5692/13	9.8	7854/13	34.6	9364/13	29.1	10575/13	45.7
4480/13	10.0	5694/13	14.0	7960/13	67.8	9366/13	36.7	10584/13	23.4
4513/13	35.1	5729/13	12.6	8043/13	45.6	9387/13	23.6		

## ANEXO VI: Distribución de perfiles genéticos.

CODIGO	PROCEDENCIA	EDAD	SEXO	CULTIVO	BACILOSCOPIA	SUSCEPTIBILIDAD AGAR EN PLACA (APP)												MODS		LINAJE
						RIF	INH 0.2	INH 1.0	EMB	SMI	ETH	KAN	PAS	CIP	CAP	CIC	PZA	INH	RIF	
1605/2013	HDNAC	54	M	POS	++	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	BEIJING
2212/2013	CS. C. PACHACUTEC	39	F	POS	++	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	S	S	R	R	UGANDA
2296/2013	CS. A. BARTON	38	M	POS	++	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	LAM
2832/2013	H. SABOGAL	48	M	POS	+++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HAARLEM
2833/2013	H. SABOGAL	85	M	POS	++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ORPHANS
2906/2013	CS. BONILLA	22	M	POS	+++	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	LAM
2996/2013	H. NAVAL	85	F	POS	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	T
3033/2013	CS. BELLA VISTA	32	M	POS	++	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	LAM
3184/2013	CS. CALLAO	73	M	POS	+	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	ORPHANS
3283/2013	MI PERÚ	37	M	POS	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BEIJING
3349/2013	H. SAN JOSE	22	M	POS	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
3359/2013	CS. GAMBETA BAJA	25	M	POS	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>M. canetti</i>
3407/2013	CS. A. BARTON	32	M	POS	+++	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	LAM
3461/2013	H. SABOGAL	61	F	POS	++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
3563/2013	UNMSM	61	M	POS	NO REPORTA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BEIJING
3585/2013	H. SABOGAL	25	F	POS	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	LAM
3679/2013	H. SAN JOSE	43	M	POS	++	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	ORPHANS
3866/2013	UNMSM	22	F	POS	NO REPORTA	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	<i>M. africanum</i>
3873/2013	CS. ALTA MAR	29	F	POS	NO REPORTA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	UGANDA
3935/2013	UNMSM	60	F	POS	+++	NO REPORTA												R	R	LAM
3938/2013	H. VENTANILLA	21	M	POS	+++	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	LAM



4266/2013	H. NAVAL	29	F	POS	+	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	LAM
4450/2013	CS. SANTA ROSA	21	F	POS	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HAARLEM
4469/2013	CS. VENTANILLA BAJA	21	F	POS	-	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	LAM
4480/2013	HNDAC	52	M	POS	++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HAARLEM
4513/2013	H. SAN JOSE	33	M	POS	PAUCIBACILAR	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
4521/2013	CS. JUAN PABLO II	51	F	POS	+	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	LAM
4540/2013	CS. GAMBETA ALTA	18	M	POS	++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	T
4543/2013	CS. SANTA ROSA	22	F	POS	++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HAARLEM
4544/2013	CS. SANTA ROSA	64	M	POS	+++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
4548/2013	HNDAC	52	M	POS	++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HAARLEM
4554/2013	H. VENTANILLA	31	F	POS	++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
4666/2013	UNMSM	20	F	POS	NO REPORTA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HAARLEM
4725/2013	DIRESA CALLAO	32	F	POS	+	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	ORPHANS
4910/2013	CS. MANUEL BONILLA	59	M	POS	++	NO REPORTA												R	UGANDA
5052/2013	CS. JUAN PABLO II	16	M	POS	++	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	LAM
5057/2013	CS. JUAN PABLO II	18	M	POS	-	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	HAARLEM
5086/2013	PENAL SARITA COLONIA	37	M	POS	+++	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	R	LAM
5099/2013	PENAL SARITA COLONIA	28	M	POS	+	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	LAM
5100/2013	DIRESA CALLAO	43	M	POS	++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
5186/2013	H. SABOGAL	43	F	POS	+	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	LAM
5360/2013	DIRESA CALLAO	23	M	POS	++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
5503/2013	HNDAC	54	M	POS	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BEIJING
5530/2013	H. SABOGAL	27	M	POS	++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
5564/2013	CS. MI PERÚ	69	F	POS	+++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HAARLEM
5569/2013	CS. C. PACHACUTEC	66	M	POS	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HAARLEM
5575/2013	CS. LUIS FELIPE	24	M	POS	++	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	LAM



7291/2013	CS. SAN JUAN BOSCO	28	M	POS	-	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	LAM
7317/2013	H. SAN JOSE	66	F	POS	+++	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	HAARLEM
7533/2013	H. SAN JOSE	26	M	POS	+++	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	LAM
7740/2013	H. SABOGAL	37	F	POS	+++	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	LAM
7766/2013	CS. GAMBETA ALTA	23	M	POS	+++	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	LAM
7854/2013	CS. 200 MILLAS	21	M	POS	+++	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	LAM
7960/2013	HNDAC	35	M	POS	++	NO REPORTA															T
8043/2013	CS. CALLAO	42	M	POS	++	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	LAM
8351/2013	PENAL SARITA COLONIA	30	M	POS	++	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	LAM
8478/2013	HNDAC	31	M	POS	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
8547/2013	CS. PREVI	24	M	POS	+++	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	LAM
8604/2013	CS. SANTA FE	23	M	POS	PAUCIBACILAR	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>M. africanum</i>
8638/2013	CS. ALTA MAR	26	F	POS	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	BEIJING
8714/2013	CS. BONILLA	17	M	POS	+++	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	LAM
8715/2013	CS. STA ROSA PACHACUTEC	21	M	POS	++	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	LAM
8720/2013	CS. PREVI	24	M	POS	+++	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	LAM
8821/2013	CS. LA PERLA	44	M	POS	+	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	-	R	R	R	UGANDA
8838/2013	CS. CALLAO	79	F	POS	+++	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	LAM
8853/2013	CS. GAMBETA ALTA	20	F	POS	++	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	-	R	R	R	BEIJING
8895/2013	PENAL SARITA COLONIA	39	M	POS	NO REPORTA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	LAM
8997/2013	H. SABOGAL	73	M	POS	6 BAAR	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>M. bovis</i>
9084/2013	DIRESA CALLAO	77	F	POS	+	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	UGANDA
9086/2013	DIRESA CALLAO	22	M	POS	+++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ORPHANS
9172/2013	H. NAVAL	46	M	POS	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ORPHANS
9182/2013	CS. A. BARTON	22	F	POS	++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>M. canetti</i>
9267/2013	H. SABOGAL	26	M	POS	++	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HAARLEM

9278/2013	CS. BOTERIN	26	F	POS		+		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
9283/2013	CS. PUERTO NUEVO	32	M	POS	NO REPORTA			R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	LAM
9302/2013	CS. OQUEENDO	33	F	POS		++		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BEIJING
9307/2013	H. NAVAL	36	M	POS		+++		R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	LAM
9311/2013	PENAL SARITA COLONIA	27	M	POS		+++		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	BEIJING
9345/2013	CS. GAMBETA ALTA	27	M	POS		+		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
9364/2013	CS. MI PERÚ	19	M	POS		+		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ORPHANS
9366/2013	CS. MI PERÚ	19	M	POS		+		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ORPHANS
9387/2013	H. SABOGAL	57	M	POS	NO REPORTA			R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	LAM
9398/2013	HNDAC	56	M	POS		+++		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ORPHANS
9404/2013	CS. A. BARTON	23	M	POS		+		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
9405/2013	CS. A. BARTON	50	F	POS		+		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
9417/2013	CS. C. PACHACUTEC	51	M	POS		+		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HAARLEM
9418/2013	DIRESA CALLAO	19	F	POS		+++		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
9428/2013	DIRESA CALLAO	32	M	POS		+++		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
9432/2013	CS. A. BARTON	53	M	POS		+		R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	HAARLEM
9434/2013	CS. SAN JUAN BOSCO	41	M	POS		++		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HAARLEM
9437/2013	CS. CALLAO	42	M	POS		++		R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	UGANDA
9461/2013	CS. MI PERÚ	19	M	POS		+		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	ORPHANS
9464/2013	H. NAVAL	21	M	POS		-		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	LAM
9485/2013	PENAL SARITA COLONIA	30	M	POS		++		R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	LAM
9499/2013	CS. GAMBETA ALTA	23	M	POS		+++		R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	LAM
9506/2013	CS. RAMON CASTILLA	23	M	POS		+++		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	HAARLEM
9514/2013	CS. PUERTO NUEVO	32	M	POS		+		R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	LAM
9519/2013	H. VENTANILLA	28	M	POS		++		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	UGANDA
9520/2013	H. VENTANILLA	28	M	POS		++		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	UGANDA



**ANEXO VII:** Árbol filogenético NJ de 133 cepas de *M. tuberculosis* de la Región Callao + 186 cepas de *M. tuberculosis* de la base de datos SpolDB 4.0.

